

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**



**DEFINIENDO LA ETIOPATOGENESIS DEL  
SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE CREATINA  
CEREBRAL**

**PATRICIA ALCAIDE ALONSO  
TESIS DOCTORAL  
Madrid, 2010**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**DEFINIENDO LA ETIOPATOGENESIS DEL  
SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE CREATINA  
CEREBRAL**

**Directoras de tesis:**

**Dra. Pilar Rodríguez-Pombo  
Dra. Begoña Merinero Cortés**

**Tutora:**

**Prof. Magdalena Ugarte**

**Memoria presentada por la Licenciada Patricia Alcaide Alonso  
para optar al grado de Doctor en Ciencias**



Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de la Prof. Magdalena Ugarte, Catedrática del Departamento de Biología Molecular en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” de la Universidad Autónoma de Madrid, con la ayuda de una beca concedida por el Ministerio de Sanidad y Consumo-Instituto de Salud Carlos III (2006-2008) y una beca concedida por la Asociación para el Estudio de las Metabolopatías Congénitas (2008-2010).



*Sabio es aquel que constantemente se maravilla.*

André Gide (1859-1951) Escritor francés





*A mis padres,  
Mario y Olga*



## *AGRADECIMIENTOS*

*Ahora que llega el momento de recapacitar y de echar la vista atrás, solo puedo sentirme agradecida con la vida por haber puesto en mi camino a muchas personas maravillosas sin las que esta tesis no hubiera sido posible, por eso, aún a riesgo de extenderme un poco no quiero dejarme a nadie en el tintero:*

*Ante todo quiero agradecerle a Magdalena Ugarte la oportunidad que me brindó al aceptarme en su laboratorio, de crecer en conocimientos y como persona, por apoyarme para realizar mi tesis y por su calidad humana.*

*Por supuesto, no tengo palabras para agradecer a mis directoras de tesis todo lo que se han esforzado, por sus enseñanzas, dedicación, paciencia y confianza en mí. Porque creo que hemos formado un gran equipo. A Pili agradecerle todo lo que me ha enseñado, por su sinceridad, su entrega, por transmitirme su amor por la ciencia, por sus consejos como amiga. A Bego por mostrarme lo bonito de este mundo, por hacerme participe de él, por esforzarse tanto por ayudarme siempre, por valorar mi trabajo, por su fortaleza acompañada de humildad y ternura.*

*A Celia porque desde el primer momento me acogió con los brazos abiertos, por su cercanía, su simpatía y sus ánimos.*

*A Carmen por transmitirme sus conocimientos, sus consejos, por su energía, vitalidad y fortaleza.*

*A Isaac y Pedro del “equipo creatina”, por su gran labor en este proyecto, sin su ayuda no hubiera sido posible, a Pedro por sus enseñanzas y a Isaac por esa loca forma de ser, a los dos por interesarse por mí, por los aperitivos y bromas.*

*A Charo por hacer tan agradables las de horas de tren que compartimos.*

*A Manu por ser tan majo, por las risas en el curso de prevención.*

*A Mery por su alegría y los buenos momentos dentro y fuera del labo.*

*A Celia “la pequeña” por ser generosa y amable, porque formará parte de la nueva generación de becarias.*

*A Gonzalo por su ayuda con el ordenador, por sus muchos favores, por su generosidad, por nuestras charlas y consejos en las horas de atasco, por descubrirme las “dos ruedas”, por ser mi amigo.*

*A las “secres” Isa, Susana, Julia, Eva y Ana por ayudarme con papeleos y por tener siempre una sonrisa para mí.*

*Al resto de personas de diagnóstico M<sup>a</sup> Jesús, Paloma, Fernando, Leticia, Gema, Marisé, Marina y Marga por ser siempre agradables, haberme ayudado cuando me hizo falta e interesarse por mí.*

*A mi gente de genética; a Belén y Lourdes por ser ejemplo de constancia y superación y por aportar muchas cosas al laboratorio.*

*A Eva por enseñarme a medir R<sub>CS</sub>, por su gran ayuda con el “paper”, por los buenos consejos y por los momentos de risas, a Alex por su sencillez y discreción, porque desde el principio me ofreció su ayuda, por compartir*

experiencias y por gustarle nuestra música. A las dos por fomentar el buen rollo, por vuestro ejemplo y por compartir espacio mucho tiempo.

A nuestras técnicas Fátima, Rosa y Ascen, gracias por tantas cosas... a Fátima por las charlas en el tren, por interesarse siempre por como estoy, por su cariño y apoyo, a Rosa, por mis primeras PCR,s, por su paciencia, su inestimable ayuda con mi trabajo, por escucharme, por sorprendernos con dulces y por aportar tantos buenos momentos, y a Ascen por su humildad, bondad y su ayuda constante y desinteresada, por la paz que transmite. Al recientemente incorporado Borja por sus ganas de aprender.

A las becarias, mis niñas...y niño. A Ana V. porque nos ha unido mucho compartir poyata y pipetas, por ser tan bichillo y por los bailoteos.

A Paula por nuestras charlas, dudas y consejos por su calma pero también por su energía y carácter, por su amor a la ciencia, por muchos buenos momentos.

A Ana J. por su constancia, por su ayuda y por las recetas americanas.

A Lorena por su sencillez, su generosidad, su simpatía y espontaneidad.

A Alfonso por ser simplemente genial, por ser trabajador y divertido a partes iguales, por ser uno más del grupo enseguida, por sumar muchos buenos momentos a nuestra lista, por ser tan dispuesto y generoso.

A Roci por ser buena compañera, divertida, por saber escuchar, por dar buenos consejos, por compartir nuestras cosas.

A Sandra por ser como es, por su naturalidad, transparencia, por ser atenta, alegre, por haber dejado su isla para venir. También por añadir a Helder (o José) al grupo.

A la más nueva, mi tocaya Patricia por encajar tan bien con nosotras.

A Rocío 411 por hacer las comidas tan divertidas, por ser tan genial.

A los estudiantes nuevos y a los que pasaron por el laboratorio y que no puedo olvidar, a Ana R. por acogerme cuando empecé, a Maja por su amistad y por cuidarla en la distancia, a Abel por su simpatía, a Laura (y Jonai) por sus ganas de trabajar y ser encantadores, a Libertad por su optimismo, a Cristina de canarias por su entusiasmo por la ciencia y alegría constante, y a mi Cris Aguado, por ser una persona extraordinaria, por su ayuda desde el principio, por compartir tus sentimientos, por ser tan humilde y buena persona, por transmitir alegría de vivir, por tu entrega para con los demás.

A todos vosotros, por tantas cosas..., por compartir tan pacíficamente el espacio, por tantas comidas, comidas de Navidad, desayunos, aperitivos, cafés al sol y hasta cenas, algún congreso, por cada risa, por cada sonrisa, por nuestras confidencias, por darme apoyo cuando lo necesité, por estar ahí siempre, por vuestra ayuda, por ser compañeros y no competidores, porque hicisteis que me sintiera bien de venir cada día, por los momentos fuera del laboratorio, por ser como sois.

A los profesores de la universidad que consiguieron descubrirme este mundo tan bonito, a tanta gente del centro que estos años me ha ayudado, enseñado y motivado. A todas esas personas que pasaron por mi vida y de algún modo dejaron su huella.

*Quiero agradecer especialmente a mi grupo de amigos de “la uni” a Tere, Álvaro, Raúl, Sara, Noe, Paula, Chicky, Laura y demás “anexos” del grupo, por compartir los años de exámenes, de prácticas, de dudas y proyectos futuros, por vuestra amistad, por animarme a no tirar nunca la toalla, por tantas timbas juntos... y las que nos quedan.*

*A mis amigas “del cole”, las de siempre, por haber crecido juntas y compartido tantas cosas las cinco. Al resto de mis amigos porque siempre están ahí, incluso algunos estando lejos, porque tengo suerte de tenerlos.*

*A Álvaro por formar parte de tantos buenos momentos, por interesarse por mi trabajo, por escucharme y ser un gran apoyo para mí, por estar a mi lado.*

*A mi familia, por estar tan unida, por cuidarme, porque son muy importantes para mí, gracias también a los que desgraciadamente faltan pero que no se olvidan.*

*A mis padres, por esforzarse tanto para darme la oportunidad de estudiar y de tener una vida tan feliz, por ser tan luchadores, inteligentes y buenos, por ser siempre mi ejemplo a seguir, por inculcarme los valores que hoy rigen mi vida, porque son lo más preciado que tengo, por apoyarme, en definitiva por quererme tanto.*

*A todos muchas gracias, os llevo siempre conmigo*



## **INDICE**

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>2</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. LA CREATINA .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. SÍNTESIS ENDÓGENA DE CREATINA .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3. TRANSPORTE ACTIVO DE LA CREATINA .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4. LA CREATINA EN EL CEREBRO .....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 CREATINA Y SU IMPORTANCIA EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE CREATINA CEREBRAL .....</b>	<b>14</b>
1.6.1 Tratamiento .....	17
1.6.2 Alteraciones bioquímicas y diagnóstico de pacientes .....	18
1.6.3 Espectro mutacional.....	18
<b>1.7 INTEGRACIÓN DE LAS VARIACIONES EN EL DNA, EXPRESIÓN GÉNICA Y         FENOTIPO CLÍNICO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.8 ESTRÉS CELULAR Y CREATINA .....</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 MATERIAL .....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Reactivos y aparatos.....	34
3.1.2 Material biológico .....	35
3.1.2.1 Muestras biológicas.....	35
3.1.2.2 Cepas bacterianas, vectores plasmídicos y anticuerpos .....	36
<b>3.2 MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Análisis de fluidos fisiológicos .....	37
3.2.2 Cultivo celular.....	37
3.2.3 Estudios de transporte de creatina .....	38

3.2.4	Actividad GAMT .....	39
3.2.5	Aislamiento de ácidos nucleicos .....	39
3.2.6	Amplificación de ácidos nucleicos.....	39
3.2.6.1	Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	39
3.2.6.2	Amplificación de cDNA mediante transcripción reversa del mRNA y posterior reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) .....	42
3.2.7	Purificación de DNA .....	43
3.2.8	Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos .....	43
3.2.9	Secuenciación.....	44
3.2.10	Análisis de mutaciones y nomenclatura .....	44
3.2.11	Cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR .....	45
3.2.12	Clonaje de cDNA.....	46
3.2.13	Ensayos de ROS y apoptosis .....	46
3.2.14	Medida del contenido de DNA. Análisis de ciclo celular .....	47
3.2.15	Extracción de proteína, electroforesis, transferencia e inmunodetección de las proteínas (Western blot) .....	48
3.2.16	Medida de creatina intracelular .....	48
3.2.17	Soporte informático .....	49
3.2.18	Análisis estadístico.....	49
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>SELECCIÓN DE PACIENTES .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>TRANSPORTE DE CREATINA .....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Medida de transporte de creatina en fibroblastos control .....	54
4.2.2	Medida del transporte de creatina en fibroblastos de pacientes con sospecha de defecto en el transportador.....	56
<b>4.3</b>	<b>ACTIVIDAD GAMT .....</b>	<b>57</b>
<b>4.4</b>	<b>CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS POSIBLES PACIENTES.....</b>	<b>58</b>
4.4.1	Estudio genético de pacientes con sospecha de deficiencia en el transporte de creatina (gen SLC6A8) .....	58
4.4.2	Estudio genético de pacientes con sospecha de deficiencia de GAMT .....	59
4.4.3	Estudio genético en pacientes con sospecha de deficiencia de AGAT .....	60
<b>4.5</b>	<b>ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS IDENTIFICADAS .....</b>	<b>60</b>



4.5.1	Estudio <i>in silico</i> de la posible patogenicidad de las variaciones nucleotídicas .....	61
4.5.2	Análisis de transcritos de SLC6A8 y GAMT.....	66
4.5.3	Caracterización de mutaciones susceptibles de provocar activación de NMD.....	70
4.5.4	Caracterización de la proteína CRT1 .....	75
<b>4.6</b>	<b>ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LOS DEFECTOS EN CREATINA CEREBRAL SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR .....</b>	<b>76</b>
4.6.1	Estudio de viabilidad celular.....	76
4.6.2	Contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno .....	77
4.6.3	Activación de p38MAPK.....	78
4.6.4	Medida de apoptosis celular .....	79
4.6.5	Progresión del ciclo celular .....	81
4.6.6	Activación de p53.....	84
4.6.7	Medida de los niveles intracelulares de Cr .....	84
<b>4.7</b>	<b>PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES SLC6A8 Y GAMT.....</b>	<b>85</b>
<b>4.8</b>	<b>EFFECTO DE LA CREATINA SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS METABÓLICO .....</b>	<b>86</b>
<b>4.9</b>	<b>CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO .....</b>	<b>88</b>
<b>4.10</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>90</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>92</b>
5.1	DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES .....	94
5.2	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CDS Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS .....	96
5.3	IMPACTO DE LOS DEFECTOS DE CREATINA CEREBRAL SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR.....	100
5.4	PERFIL TRANSCRIPCIONAL .....	103
5.5	CREATINA COMO POSIBLE TERAPIA.....	104

5.6	INTEGRACIÓN DE LAS VARIACIONES EN EL DNA, EXPRESIÓN GÉNICA Y FENOTIPO CLÍNICO. POSIBLE RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO .....	105
-----	---	-----

6.	CONCLUSIONES.....	110
----	-------------------	-----

7.	BIBLIOGRAFÍA.....	114
----	-------------------	-----

8.	ANEXO .....	130
----	-------------	-----

9.	PUBLICACIONES .....	134
----	---------------------	-----

## ABREVIATURAS

**<sup>1</sup>H-MRS:** Resonancia magnética con espectroscopía de protones  
**ADP:** Adenosina difosfato  
**AGAT:** L-arginina:glicina amidinotransferasa  
**ATP:** Adenosina trifosfato  
**CDS:** Síndrome de deficiencia de creatina (*Creatine Deficiency Syndrome*)  
**CK:** Creatina Kinasa  
**Cr:** Creatina  
**Crn:** Creatinina  
**Ct:** Ciclo umbral (*cycle threshold*)  
**CRT1:** Transportador de creatina (Variante 1) codificada por el gen SLC6A8  
**CRT2:** Transportador de creatina (Variante 2) codificada por el gen SLC6A10  
**DMSO:** dimetil sulfóxido  
**EDTA:** Ácido etilen-diamin-tetraacético  
**EMH:** Enfermedades metabólicas hereditarias  
**ESE:** Secuencia exónica activadora de splicing (*exonic splicing enhancer*)  
**FBS:** Suero fetal bovino  
**FCCP:** Carbonilcianida-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona  
**GAA:** Ácido guanidinoacético o guanidinoacetato  
**GAMT:** N-guanidinoacetato metiltransferasa  
**GAPDH:** Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa  
**GPA:** Ácido guanidinopropiónico  
**GUSB:** beta -Glucoronidasa  
**H2DCFDA:** 2'7' Diacetato de fluoresceína  
**IP:** Ioduro de propidio  
**IPTG:** Isopropil tiogalactósido  
**MEM:** Medio mínimo esencial de Eagle  
**mRNA:** RNA mensajero  
**MS-MS:** Espectrometría de masas en tandem  
**NMD:** *Non mediated decay*  
**PBS:** Tampón fosfato salino  
**PCr:** Fosfocreatina  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)  
**PDB:** Banco de datos de proteínas (*Protein Data Bank*)  
**Proteína SR:** Proteína reguladora de splicing (*serine-arginine protein*)  
**PTC:** Codón de parada prematura (*Premature Terminal Codon*)  
**qRT-PCR:** Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**RNAi:** Ácido ribonucleico interferente  
**ROS:** Especies reactivas de oxígeno  
**RQ:** Cuantificación relativa (*relative quantity*)  
**RT:** Temperatura ambiente (*Room temperature*)  
**RT-PCR:** Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa  
**SLC6A8:** Gen que codifica para el CRT1 "Solute carrier family 6, member 8"  
**SNC:** Sistema nervioso central  
**SNP:** Polimorfismo de único nucleótido (*single nucleotide polymorphism*)  
**WT:** Salvaje o normal (*wild type*)  
**WB:** Western blot

Algunos términos ingleses, ampliamente utilizados en biología molecular y sin clara traducción en castellano, se muestran a lo largo de todo el trabajo en letra cursiva.



## SUMMARY

Creatine (Cr) plays an essential role for the maintenance of ATP levels in tissues with high energy demand, such as brain. Defects affecting the Cr biosynthesis (arginine: glycine amidino transferase (AGAT) and guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) or the transporter (CRT1) are known as creatine deficiency syndrome (CDS). In all these disorders the common hallmark is cerebral creatine deficiency which causes a wide range of neurological manifestations. They constitute a group of rare inherited metabolic diseases which pathophysiology is still under investigation. The aims of this work have been improving the diagnosis of these defects studying the patients at biochemical and genetic level, and exploring the impact of our cohort of natural CDS mutants on different variables of cellular metabolic stress. Nine 9 CDS patients have been identified in a prospective screening based on abnormal metabolite excretion or decreased creatine signal in brain <sup>1</sup>H-MRS in a cohort of patients with mental retardation (MR) and/or suspected metabolic disorder. Six CRT1 and three GAMT cases were identified. Confirmatory diagnosis was assessed by measuring creatine uptake and GAMT activity in cultured fibroblasts, respectively. Direct sequencing analysis of SLC6A8 gene revealed six sequence variations, four of them novel: c.462G>A (p.W154X); c.1079\_1081delTCT (p.F360del); c.1210G>C (p.A404P); c.1396G>A (p.G466R). The mutational spectrum of the GAMT gene included 5 allelic variants, 3 of them novel: c.145delT (p.Y49fs) which appeared in homozygous fashion and c.316C>T (p.Q106X) and c.407C>T (p.T136M), both in heterozygous fashion. All changes identified in both genes were characterised *in silico*, *in vitro* and *in vivo*, and all of them fulfilled several criteria to be considered as pathogenic mutations. Our results confirm the presence of CDS patients in a broad population of neurological patients including those with MR of unknown aetiology highlighting the importance of screening for these potentially treatable disorders. Furthermore, we analyzed the impact of these CDS mutants on parameters of metabolic cellular stress, such as ROS production, aberrant cell proliferation, activation of stress mediated signalling pathways and apoptosis. An increase of intracellular ROS content and percentage of apoptotic cells as well as an altered profile in cell cycle progression and activation of p53 and p38MAPK were detected in some CRT1 and GAMT fibroblasts, mostly those carrying null alleles. Based on intracellular creatine levels, contribution of energy depletion to metabolic stress could only be demonstrated in selected CRT1 cells. So although genotype-phenotype correlation is not straightforward, this association seems to be clearer in CRT1 patients. We consider that these studies exert an essential impact in clinics because they support the potential of reducing intracellular ROS and oxidative-stress-induced apoptosis as a novel strategy for the treatment of these disabling diseases.



# 1. INTRODUCCIÓN

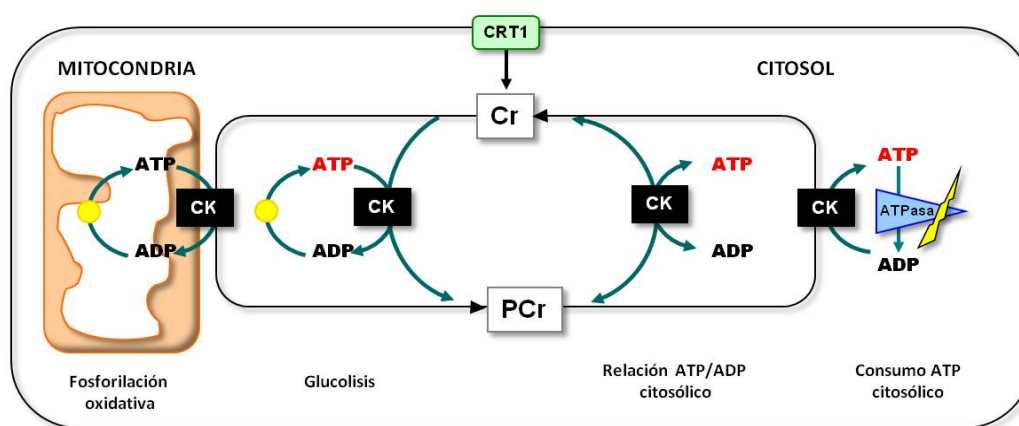






## 1.1. LA CREATINA

La creatina (Cr) o  $\alpha$ -ácido metilguanidinoacético fue identificada en 1832 por el químico francés Michel Eugène Chevreul quien descubrió un componente del músculo esquelético al que denominó con el nombre griego *Kreas*, (carne) y que relacionó con la producción de trabajo muscular. Efectivamente, la Cr tiene un papel esencial en el almacenamiento y liberación de grandes cantidades de energía. La Cr es introducida en las células de los tejidos gracias a la acción de un transportador de membrana. Allí es fosforilada a fosfocreatina (PCr) en una reacción reversible catalizada por la creatina kinasa (CK) para la que se han descrito varias isoformas (Wallimann, et al., 1992). La PCr es reutilizada para generar ATP cuando es necesario, gracias a la formación-rotura del enlace fosfato, lo que proporciona un sistema de tampón fosfato de alta energía, especialmente relevante en tejidos con alta demanda energética como corazón, cerebro y músculo (Fig.1). En mamíferos, la Cr puede ser obtenida gracias a los aportes nutricionales y/o a través de una ruta de síntesis endógena. Cuando la demanda energética es alta, el transporte de Cr se convierte en un elemento fundamental de su homeostasis, mientras que para tejidos como el hígado, riñon y páncreas, es la síntesis endógena la ruta predominante (Brosnan, et al., 2007; Wyss and Schulze, 2002).

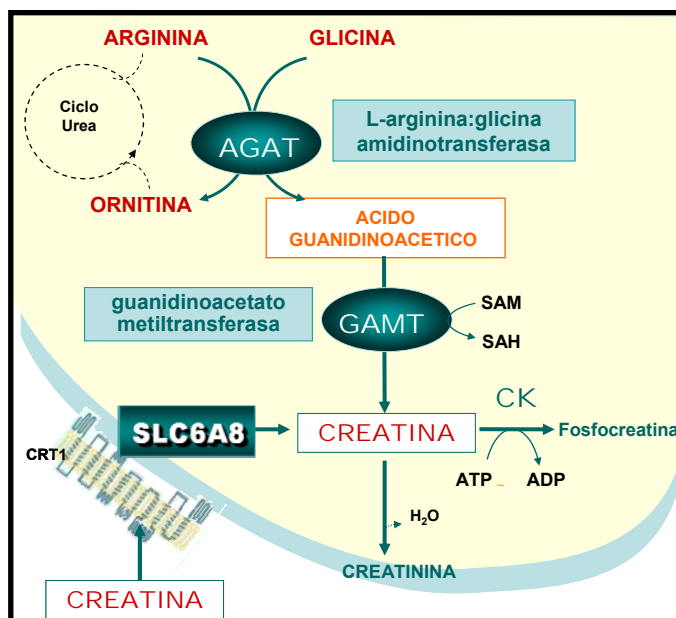


**Fig.1: Esquema del sistema Cr/PCr.** La Cr que ha sido introducida en la célula o sintetizada en ella se transforma a PCr por la acción de la CK mitocondrial acoplada a la fosforilación oxidativa o por la CK citosólica acoplada a la glucólisis. La PCr abandona la mitocondria y se suma a la fosforilada en el citosol para mantener la relación ATP/ADP para el consumo local actuando así como almacén de rápida disposición de energía. Figura modificada de (Saks, et al., 2006).

Como la demanda y el suministro de la energía celular están equilibrados y meticulosamente regulados para el uso eficiente de la misma, el 95 % de la Cr total del organismo se encuentra en el músculo esquelético mientras que el 5% restante se reparte entre cerebro, corazón, hígado, riñones, pulmones, bazo y testículos (Wyss and Schulze, 2002).

## 1.2. SÍNTESIS ENDÓGENA DE CREATINA

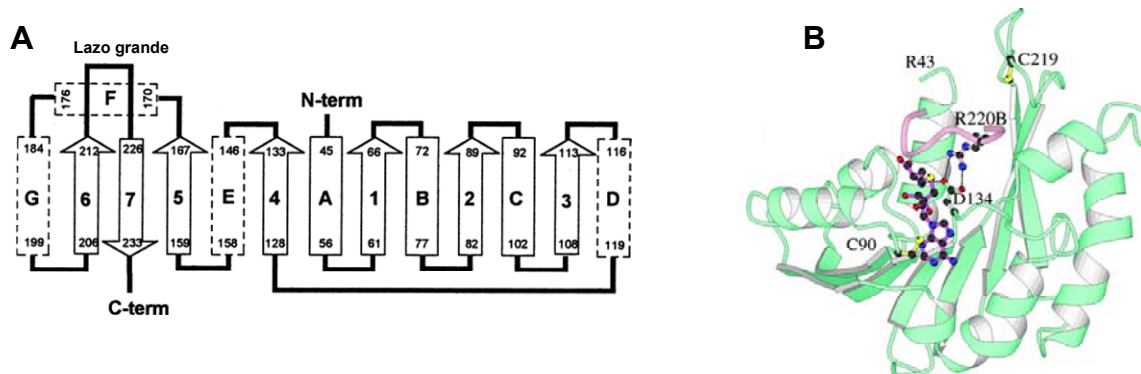
La ruta de síntesis incluye dos reacciones enzimáticas. La primera mitocondrial cataliza la transferencia del grupo amidino de la arginina a glicina para sintetizar L-ornitina y guanidinoacetato (GAA) por acción de la enzima L-arginina:glicina amidinotransferasa (**AGAT**; EC 2.1.4.1). La segunda citosólica, en la que el GAA se convierte en Cr por la acción de la enzima N-guanidinoacetato metiltransferasa (**GAMT**; EC 2.1.1.2) en presencia de S-adenosil-L-metionina (SAM). Finalmente el exceso de Cr y PCr resultado de esta vía, se degrada a creatinina (Crn) por un proceso no enzimático, y se excretará por la orina, siendo su eliminación diaria directamente proporcional a la Cr corporal total del individuo (Fig.2).



**Fig.2 Metabolismo de la creatina.** Reacciones enzimáticas implicadas en la síntesis endógena y transporte de Cr. También se representa la formación de ATP por la acción de la enzima CK y la reacción de conversión no enzimática a creatinina.

El gen AGAT (MIM # 602360) está localizado en el cromosoma 15q15.3 y su cDNA tiene 2602pb (Item, et al., 2001). Este gen codifica para una proteína precursora de 423 aminoácidos, que tras eliminar los 37 últimos residuos N-terminales después del transporte al espacio intermembrana mitocondrial, genera una proteína madura de 386 aminoácidos (Gross, et al., 1986). El gen GAMT (MIM # 601240) mapea en el cromosoma 19p13.3 (Chae, et al., 1998; Item, et al., 2004). Para el gen GAMT se han descrito dos transcritos que dan lugar a dos isoformas diferentes de la proteína; la variante A o 1 corresponde a un cDNA de 1063pb (NM\_000156), que se traduce a una proteína de 236 aminoácidos para la que se ha descrito actividad catalítica (Im, et al., 1979) y la variante B o 2 corresponde a un cDNA de 1110 pb (NM\_138924) que pierde el exón 6 y retiene parte del intrón 5. En este caso la proteína resultante es de 269 aminoácidos y hasta el momento no se ha descrito actividad catalítica. La proteína GAMT se ha cristalizado a partir de hígado de rata, tras eliminar los

últimos 42 aminoácidos del carboxilo terminal y con S-adenosil-L-homocisteina (SAH) en su sitio activo y muestra un patrón de plegamiento muy similar al de otras metiltransferasas (Komoto, et al., 2002). Es una proteína monomérica con un único dominio formado por 7  $\alpha$ -hélices y 7 láminas  $\beta$  (Fig.3). A partir de la estructura cristalina se han identificado varios residuos aminoacídicos implicados en las uniones a SAH y GAA. La proteína de rata tiene una homología del 86,9% en su secuencia de aminoácidos con la proteína humana.



**Fig. 3 Proteína GAMT.** **A)** Diagrama de la topología de GAMT. Los números indican la posición del aminoácido. Las líneas discontinuas indican hélices debajo de láminas. **B)** Estructura molecular tridimensional de GAMT. El sitio de unión de SAH, Asp134, Cys90 y Cys219 se muestra en amarillo. El lazo grande se destaca en rosa junto con Arg220B. Los posibles puentes de hidrógeno entre Asp134 y Arg220B se representan con líneas. Imágenes modificadas de Komoto et.al 2002.

### 1.3. TRANSPORTE ACTIVO DE LA CREATINA

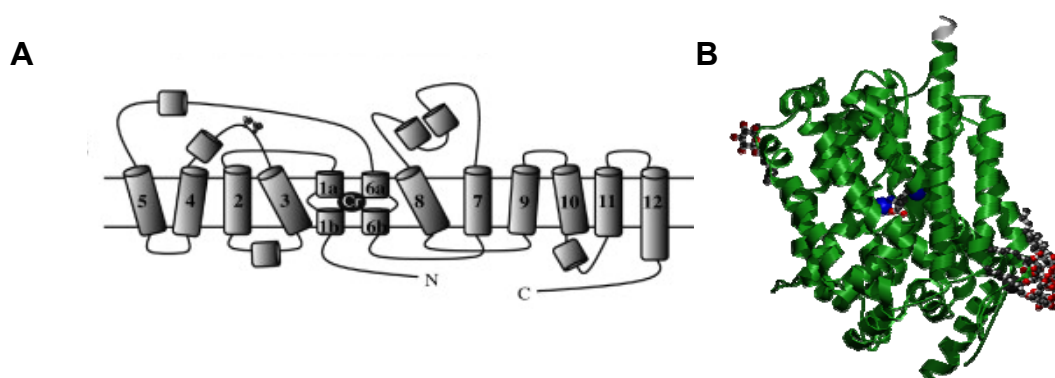
La Cr es transportada por la sangre hasta el músculo, corazón y cerebro, donde será convertida a PCr. Accede a estos órganos a través de un sistema de transporte activo dependiente de  $\text{Na}^+$ , que es fundamental para mantener su homeostasis en tejidos que carecen de síntesis endógena (Fig.2). El transportador de Cr (**CRT1**) es miembro de una superfamilia de neurotransmisores dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (SLC6), que incluye entre otros, los transportadores de glicina, dopamina, serotonina y de GABA, siendo un representante de estos últimos transportadores, el GAT-1, aquel con el que tiene mayor homología. El transportador de Cr presenta también una gran homología con transportadores ortólogos de la misma familia (Snow and Murphy, 2001).

En humanos se han identificado dos genes implicados en el transporte de Cr. El principal es el gen SLC6A8 (MIM # 300036) localizado en el cromosoma Xq28 y que consta de 13 exones que se extienden a lo largo de 8,4kb y el gen SLC6A10 que mapea en el cromosoma 16 (16p11.2) (Xu, et al., 1997), consta de 9 exones y comparte con el gen SLC6A8 una homología del 97% (Salomons, et al., 2001).

El transportador de Cr (**CRT1**), codificado por el gen SLC6A8, consta de 635 aminoácidos y su expresión es ubicua con especial relevancia en tejidos con alta demanda energética como son músculo y cerebro (Braissant and Henry, 2008). El gen SLC6A10 codifica para el transportador conocido como **CRT2** y posee un codón de parada prematura en el exón 4 (Eichler, et al., 1996). Se ha descrito que este gen se expresa en testículo, donde se le ha relacionado con la necesidad de aporte energético a los espermatozoides durante el proceso de meiosis, y recientemente también en cerebro (Bayou, et al., 2008).

Para el gen SLC6A8 se han descrito varios transcritos alternativos, uno de 4,3 kb donde se han identificado cambios patogénicos, y otros dos de menor tamaño. Además, recientemente se ha descrito un transcrito alternativo llamado SLC6A8C identificado en ratón y humanos que se corresponde con los últimos 270 aminoácidos de la proteína codificada por SLC6A8. Tiene expresión confirmada en tejidos de alta demanda energética y se postula que podría actuar como posible regulador de la oligomerización de SLC6A8 (Martinez-Munoz, et al., 2008).

La cristalización por rayos X del transportador de Leucina en *Aquifex aeolicus*, un homólogo procariota del transportador de Cr ha permitido obtener más información sobre esta proteína (Yamashita, et al., 2005). Este transportador parece tener una homología del 20-25% con respecto a sus homólogos eucariotas (Dodd and Christie, 2007). El CRT1, como otros transportadores de su familia, presenta 12 dominios transmembrana (Fig.4). Las regiones más variables en los otros miembros de esta familia comprenden la región de los dominios transmembrana 9 al 11 así como ambos extremos de la proteína (Nash, et al., 1994). Para el CRT1 se han descrito dos aminoácidos principales glicosilados, la asparragina<sup>192</sup> y la asparragina<sup>197</sup>, localizados en la región extracelular entre los dominios 2 y 3 que tienen una gran relevancia para la correcta realización del transporte y para el tráfico a través de la membrana (Straumann, et al., 2006). También se ha descrito la cisteína<sup>144</sup>, localizada en el tercer dominio transmembrana, como crucial para la unión del CRT1 con el sustrato (Dodd and Christie, 2001). Hasta el momento no se ha estudiado si este transportador oligomeriza. Sin embargo, en otros transportadores SLC estrechamente relacionados con él, sí se ha observado oligomerización, incluso se ha comprobado que en algunos de ellos, la oligomerización es fundamental para que sean funcionalmente activos (Torres, et al., 2003).



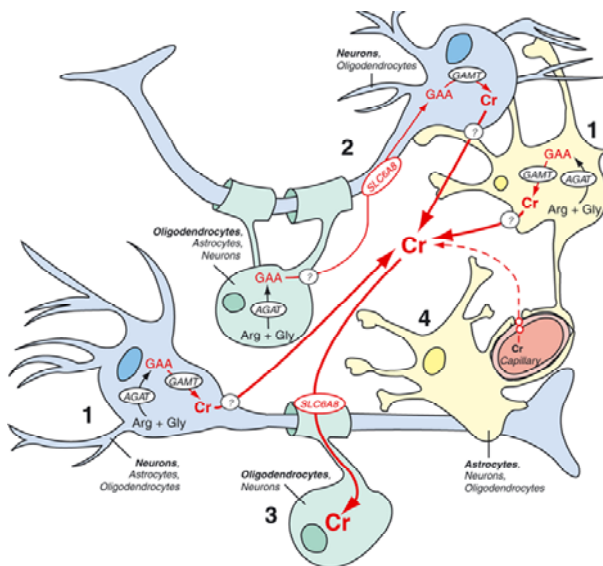
**Fig. 4: Proteína CRT1.** **A)** Diagrama de la topología del CRT1. Representación esquemática de los dominios transmembrana de SLC6A8 basada en el modelo LeuT de Yamashita (Yamashita, et al., 2005), SLC6A8 tiene dominios N- y C-terminal más largos que LeuT. **B)** Estructura molecular tridimensional de CRT1. [www.pdb.org](http://www.pdb.org) EC 2.1.1.2

## 1.4. LA CREATINA EN EL CEREBRO

Hasta el momento se conocen dos funciones principales de la Cr; la primera y más conocida es su importancia en el almacenamiento y liberación de grandes cantidades de energía tanto en el cerebro como en el resto del organismo (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). La segunda, es su papel como posible neuromodulador incluso como un verdadero neurotransmisor en el cerebro. Se ha demostrado que la Cr no es sólo sintetizada y asimilada por las neuronas sino que también es liberada de manera dependiente de potencial de membrana a espacios sinápticos (Almeida and Rosenberg, 2006). Así mismo se ha descrito que tanto la Cr, como su precursor, el GAA pueden afectar a la neurotransmisión GABAérgica actuando como agonista o antagonista parciales en receptores post-sinápticos GABA<sub>A</sub> dependiendo de las concentraciones locales de GABA (Cupello, et al., 2008). Sin embargo, todavía han de ser dilucidados ciertos aspectos como la regulación de su transporte en el cerebro, el tráfico intracelular y liberación de Cr después de un estímulo en el cerebro (Almeida, et al., 2006).

La Cr utilizada por nuestro organismo proviene bien de la síntesis endógena fundamentalmente hepática o de la dieta, y para llegar al cerebro, la Cr debe atravesar la barrera hemato-encefálica. Pero la proteína transportadora CRT1 aparentemente se expresa en células endoteliales de los microcapilares pero no en los astrocitos, que en gran medida se disponen rodeando la barrera hematoencefálica (Fig.5). Ello supone una reducción considerable de la capacidad del cerebro para importar la Cr procedente del torrente circulatorio, y aumenta su dependencia de la síntesis endógena. Según el modelo propuesto en (Braissant and Henry, 2008) la expresión de las proteínas implicadas en la homeostasis de Cr cerebral estaría compartimentalizada. Los autores describen niveles detectables de AGAT y GAMT en todos los tipos celulares en cerebro de ratones en desarrollo y adultos, lo que apoyaría la existencia de síntesis endógena y expresión del transportador en neuronas

y oligodendrocitos. Tal como se esquematiza en la Figura 5, se propone un tráfico de la Cr sintetizada por los astrocitos entre las neuronas y los oligodendrocitos (Braissant, et al., 2001) y de GAA entre las células que expresan AGAT y las que expresan GAMT. En ambos casos la entrada en la célula correspondiente requeriría la utilización del transportador CRT1. Esta interconexión de las rutas de síntesis y transporte sería de gran importancia para entender la fisiopatología de las deficiencias de Cr (Braissant and Henry, 2008).



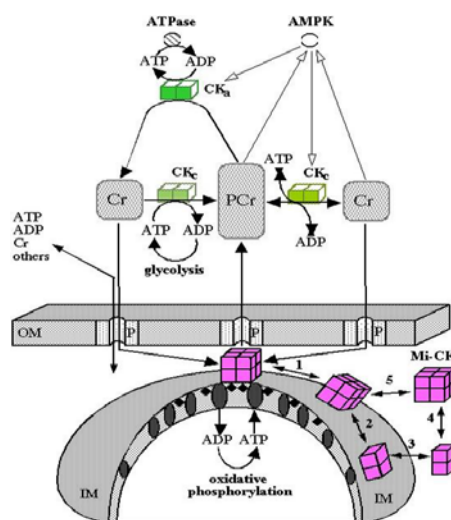
**Fig. 5: Modelo propuesto para la síntesis y transporte de Cr en SNC.** (1) Células que coexpresan AGAT y GAMT (Puede haber síntesis) (2) Células que expresan AGAT o GAMT acompañadas del tráfico de GAA entre ellas (3) Células expresan sólo SLC6A8 (células que necesitan energía) (4) Astrocitos. Arg, arginina; Gly, glicina; MCEC, células del endotelio del microcapilar; Neur, neuronas; BBB, (Blood-brain barrier) Barrera hematoencefálica. Fig modificada de Béard et.al 2010.

## 1.5 CREATINA Y SU IMPORTANCIA EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO

Células con requerimientos energéticos altos y fluctuantes como las neuronas, pueden aumentar muy rápidamente su tasa de hidrólisis de ATP y sin embargo, los niveles intracelulares de ATP se mantienen siempre constantes. Esto sólo puede conseguirse gracias a sistemas de almacenamiento energético de rápida disposición que conectan lugares de consumo energético con los de producción vía sistemas de transferencia de grupos fosfato (Hochachka, 2003). En este sentido, la Cr y el sistema CK/PCr forman parte esencial del sistema de tamponamiento para la realización de las funciones vitales del cerebro, que consume alrededor del 20% de la energía del organismo, tanto en condiciones normales como en condiciones neuropatológicas (Andres, et al., 2008). La CK es pues una enzima esencial en los eucariotas superiores puesto que está implicada en el mantenimiento de la homeostasis energética celular y regula la relación ATP/ADP (Wyss, et al., 1992). Para la enzima CK se han descrito dos isoformas, una mitocondrial (mi-CK) que ejerce su función acoplada a la fosforilación oxidativa y una citosólica (CKc) acoplada al proceso de la glucólisis. La mi-CK que se encuentra en el espacio intermembrana fosforila el ATP generado en la mitocondria



generando PCr que es liberada al citoplasma, donde se unirá a la generada por la CKc teniendo así PCr disponible que será utilizada para tamponar y regular la relación ATP/ADP citosólicos y para consumo de ATP local (Fig.6) (Wallimann, et al., 1992).



**Fig. 6: Circuito de la creatina quinasa y su asociación funcional con la fosforilación oxidativa.** El ATP es producido en la mitocondria y transfiere su grupo fosfato a la Cr que actúa como almacén de energía en forma de PCr y será dirigida hacia el sitio donde será consumido por la ATPasa. Mi-CK: isoforma mitocondrial, CKc; isoforma citosólica, AK, adenilato cinasa. Modificado de (Wallimann and Hemmer, 1994).

## 1.6 SÍNDROME DE DEFICIENCIA DE CREATINA CEREBRAL

El síndrome de deficiencia de Cr cerebral (CDS) está causado por defectos genéticos asociados a la biosíntesis o al transporte de Cr. Pertenecen al grupo de las enfermedades metabólicas hereditarias (EMH), que son patologías causadas por alteraciones adquiridas o congénitas en las proteínas implicadas en estas reacciones.

La identificación en la década de los noventa del CDS ha permitido reconocer la relevancia de esta vía metabólica para el desarrollo normal de la función cognitiva en humanos. El primer defecto descrito para la biosíntesis de Cr fue la deficiencia de GAMT (MIM # 601240), identificado por el grupo de Stockler en 1994 (Stockler, et al., 1994; Stockler, et al., 1996). Posteriormente en el año 2001 se identificaron otros dos defectos del metabolismo de la Cr, el defecto del transportador CRT1 (MIM # 300036) codificado por el gen SLC6A8 (Salomons, et al., 2001) y la deficiencia de AGAT (MIM # 602360) (Item, et al., 2001). La característica común a todos ellos es la disminución o depleción total de Cr en cerebro que se puede detectar mediante resonancia magnética con espectroscopia de protones ( $^1\text{H}$ -MRS), en cuyo espectro es apreciable una señal ausente o disminuida de Cr (Dezortova, et al., 2008). Las deficiencias de GAMT y AGAT tienen un patrón de herencia autosómico recesivo, mientras que el defecto en el transportador presenta una herencia ligada al cromosoma X.

Dado el papel esencial de la Cr en el metabolismo energético mitocondrial, una reducción o ausencia total de Cr en las células llevaría a esperar una grave miopatía en los

pacientes con CDS. Sin embargo, estos pacientes no presentan afectación muscular (al menos no como síntoma principal) sino un amplio espectro de síntomas neurológicos.

Se han descrito también alteraciones de Cr secundarias en otras EMH como en la aciduria arginosuccínica (causada por deficiencia en argininosuccinato liasa), en la citrulinemia tipo I (causada por deficiencia en argininosuccinato sintetasa) (van Spronsen, et al., 2006), en aciduria metilmalónica con homocistinuria (Bodamer, et al., 2005) y en atrofia girata (causada por deficiencia en ornitina aminotransferasa) (Nanto-Salonen, et al., 1999) en la que se observa también una disminución de la señal de Cr cerebral causada por inhibición de la AGAT por el exceso de ornitina (Valayannopoulos, et al., 2009). Todos estos defectos son susceptibles de tratamiento con Cr.

Como se ha comentado anteriormente, la expresión de AGAT, GAMT y SLC6A8 en el sistema nervioso estaría compartimentada, es decir, no se co-expresarían en la misma célula, lo que implicaría que el GAA tendría que ser transportado mediante el CRT1 entre las células para completar la síntesis. Este modelo explicaría la ausencia de Cr cerebral observada por <sup>1</sup>H-MRS en los pacientes con deficiencia en el transportador, ya que si el CRT1 no puede realizar su función, no podría transportar el GAA y por tanto no podría tener lugar la síntesis de Cr. En las deficiencias de GAMT y AGAT tampoco tendría lugar la síntesis de Cr y sólo podría ser transportada la Cr que penetrase a través de la barrera hematoencefálica y que no sería suficiente para mantener los niveles necesarios de energía en el cerebro (Braissant, et al., 2010).

- **Deficiencia del transportador de Cr (SLC6A8)**

Hasta el momento han sido diagnosticados en todo el mundo más de 150 individuos de unas 60 familias con mutaciones en el gen SLC6A8. La frecuencia de mutaciones en este gen es controvertida ya que en un estudio del 2004 se describió una frecuencia del 2% en un panel de 288 pacientes con retraso mental ligado al cromosoma X (Rosenberg, et al., 2004). Más recientemente, en una cohorte de 627 pacientes con retraso mental sin causa conocida, se ha descrito una incidencia menor del 0,3% (Sempere, et al., 2010). Los fenotipos en varones varían desde retraso mental moderado y retraso en el lenguaje (Alcaide, et al., 2010) hasta retraso mental grave, epilepsia y trastornos del comportamiento con rasgos autistas. La enfermedad se presenta generalmente a edades tempranas. También se han descrito individuos adultos con problemas neurológicos y psiquiátricos (Sempere, et al., 2009a), problemas intestinales (Kleefstra, et al., 2005), retraso del crecimiento, atrofia muscular, rasgos faciales dismórficos, microcefalia y atrofia cerebral



(Mancini, et al., 2005; Poo-Arguelles, et al., 2006) y afectaciones cardíacas (Anselm, et al., 2008). Aproximadamente el 50% de las mujeres portadoras mostraban dificultades de aprendizaje y trastornos del comportamiento. Recientemente se ha descrito a la primera mujer afecta de este síndrome (Betsalel, et al.2010).

- **Deficiencia de GAMT**

Se han descrito aproximadamente 37 individuos con esta patología en todo el mundo. La edad de aparición de los primeros síntomas varía entre los tres meses y tres años (Dhar, et al., 2009; Mercimek-Mahmutoglu, et al., 2006; Verbruggen, et al., 2007; Vodopituz, et al., 2007). Aproximadamente un 45% de los individuos con deficiencia de GAMT tienen un fenotipo grave caracterizado por retraso mental profundo, crisis convulsivas y epilepsia resistente a antiepilépticos así como graves afectaciones piramidales y extrapiramidales. Aproximadamente el 80% de los individuos tienen deterioro intelectual con IQ estimados entre 20-34. Independientemente de la edad o el grado de discapacidad, todos los individuos afectados manejan un vocabulario muy reducido. La severidad de la discapacidad intelectual incluye manifestaciones desde graves hasta leves. El 92% de los individuos afectados presentan ataques epilépticos variando desde ocasionales hasta resistentes a fármacos. En el 48% de los pacientes se observó trastornos del movimiento principalmente extrapiramidal, incluyendo corea, atetosis y ataxia. El 68% de los individuos afectados tienen trastornos del comportamiento como hiperactividad, autismo o auto agresión (Mercimek-Mahmutoglu, et al., 2006; Dhar, et al., 2009; Mercimek-Mahmutoglu, et al., 2009)

- **Deficiencia de AGAT**

Se han descrito en todo el mundo muy pocos pacientes con este defecto. Cuatro son de una misma familia procedente de Italia: dos hermanas con retraso inespecífico en el desarrollo y lenguaje, una de ellas sufría además ataques epilépticos febriles ocasionales (Item, et al., 2001); otro hermano fue diagnosticado a las tres semanas de vida y tratado con monohidrato de Cr a partir de los cuatro meses, y llevaba un desarrollo normal a los 18 meses de edad (Battini, et al., 2006). Igualmente está afectado un primo con los mismos síntomas (Battini, et al., 2002). Además, se han descrito otras dos familias no relacionadas (Johnston, et al., 2005) con el mismo fenotipo. Y muy recientemente se han reportado otros dos casos de dos hermanos de Israel que presentaban además afectación muscular (Edvardson, et al.,2010).

### **1.6.1 Tratamiento**

Las alteraciones homeostáticas más comunes que se presentan en las enfermedades metabólicas hereditarias se deben a fenómenos por acúmulo de sustrato (y derivados de este) y/o fenómenos por defecto del producto que deja de metabolizarse. En las enfermedades dónde se sufre un acúmulo de un sustrato, la restricción del mismo en la dieta es la base del tratamiento a largo plazo, con el fin de eliminar la formación de las sustancias tóxicas que se acumulan a partir de sus precursores. En los casos en el que el problema es la deficiencia o carencia total del producto, las terapias están orientadas hacia la administración de éste o favorecer su síntesis. Tanto el acúmulo como la deficiencia pueden afectar a otras rutas metabólicas secundarias (Lanpher, et al., 2006).

En el caso de los pacientes con deficiencia de GAMT se han de combinar ambas estrategias terapéuticas. La administración oral de monohidrato de Cr (300-400 mg/kg día), produce una cierta recuperación neurológica, así como un aumento de la señal de Cr en cerebro. Además es necesario introducir restricción de arginina (15mg/kg/día) y suplementación de ornitina (100-800 mg/kg/día) que produce una inhibición competitiva con AGAT con el fin de disminuir la acumulación de GAA, que resulta perjudicial para el organismo ya que tiene un efecto altamente epileptogénico (Schulze, et al., 1998 ; Schulze, et al., 2001 ; Schulze, et al., 2006).

En los pacientes con deficiencia de AGAT, la concentración de GAA está muy disminuida y simplemente el tratamiento con monohidrato de Cr (400 mg/kg/día) consigue evitar totalmente las secuelas neurológicas. El diagnóstico y tratamiento precoz en un neonato afecto ha permitido reestablecer los niveles normales de Cr en cerebro (Battini, et al., 2006).

Sin embargo, los pacientes con defectos en el transporte (SLC6A8) no responden a esta terapia de suplementación de Cr. Sólo se observa un aumento de peso (Poo-Arguelles, et al., 2006). En el trabajo de (Chilosi, et al., 2008) describen una mejoría neuropsicológica y un aumento en la señal de Cr en <sup>1</sup>H-MRS en un paciente tras la administración adicional de L-arginina oral durante un año. Sin embargo, no se encontró ninguna mejora tras 9 meses de administración oral de arginina en 4 pacientes españoles con deficiencia en el transporte (Fons, et al., 2008). Actualmente se están evaluando nuevas aproximaciones terapéuticas que pretenden una estimulación de la síntesis de Cr en el cerebro mediante la suplementación con grandes cantidades de arginina y glicina combinadas con altas dosis de Cr (Wilcken, et al., 2008). Otra estrategia terapéutica ha sido la utilización de compuestos lipofílicos derivados de la Cr capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica sin utilizar el transportador de Cr. Esta aproximación se basó en los resultados obtenidos tras la incubación de cortes de hipocampo de ratón con benzilester de Cr y un complejo de acetato

con PCr y magnesio, en los que se había observado un aumento de Cr en los tejidos a pesar del bloqueo funcional del transportador de Cr por el GAA (Lunardi, et al., 2006). Sin embargo, la administración de ester etílico de Cr (0,4g/kg/día) a 4 pacientes españoles durante un año no ha producido aumento de Cr cerebral, a pesar de que los datos *in vitro* apoyaban que dicho compuesto atravesaba la barrera hematoencefálica con mayor facilidad que el monohidrato de Cr (Fons, et al., 2009). Todos estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de seguir estudiando en profundidad los mecanismos por los que la Cr penetra en las células, particularmente el posible transporte pasivo.

### **1.6.2 Alteraciones bioquímicas y diagnóstico de pacientes**

Dado que los síntomas clínicos son inespecíficos y comunes a los tres defectos, el diagnóstico de los pacientes se realiza mediante la determinación de los niveles de GAA y Cr en fluidos fisiológicos (Almeida, et al., 2004). Los niveles de GAA permiten discriminar entre el defecto de GAMT (concentraciones elevadas), y de AGAT (concentraciones disminuidas). El aumento en la relación Cr/Crn en orina se utiliza como marcador diagnóstico para la identificación de la deficiencia del transportador (SLC6A8) (Arias, et al., 2006). La confirmación del diagnóstico se realiza mediante la determinación de las actividades enzimáticas GAMT o AGAT en linfoblastos, fibroblastos o biopsia hepática, y mediante el estudio del transporte de Cr en fibroblastos para el defecto del transportador (Salomons, et al., 2001).

### **1.6.3 Espectro mutacional**

Las mutaciones patogénicas son producidas por cambios puntuales, deleciones, inserciones o mutaciones de *splicing* que afectan a la fase de lectura de la proteína. Algunas de éstas pueden dar lugar a codones de parada prematura de la traducción o PTCs (*Premature Stop Codon*), que pueden implicar la eliminación de dominios esenciales para la función protéica.

- **Gen SLC6A8**

Se han descrito 33 variantes nucleotídicas patogénicas ([www.hgmd.cf.ac.uk/](http://www.hgmd.cf.ac.uk/)). En la Figura 7 se muestra el espectro mutacional del gen SLC6A8. 12 de ellas son mutaciones de cambio de aminoácido “*missense*”, 3 causan un codón de parada prematura “*nonsense*”, 10 son pequeñas deleciones, 1 gran deleción, 1 pequeña inserción y 1 gran inserción. Por tanto, podemos afirmar que la mayoría de ellas, aproximadamente el 36% de las variaciones

tendrán un efecto previsible de cambio de aminoácido. Hasta el momento no se ha descrito ninguna mutación que afecte al dominio transmembrana 3, región implicada en la unión a sustrato (Rosenberg, et al., 2007). Tampoco hay evidencia de que exista una región de mayor frecuencia de mutaciones en este gen. Sin embargo, ciertas mutaciones como c.321\_323delCTT y c.1222\_1224delTTC aparecen reportadas en la población caucásica. Todas las variaciones descritas hasta el momento se compendian en la base de datos ([http://grenada.lumc.nl/LOVD2/vumc/home.php?select\\_db=SLC6A8](http://grenada.lumc.nl/LOVD2/vumc/home.php?select_db=SLC6A8)) (Betsalel, et al.2010).

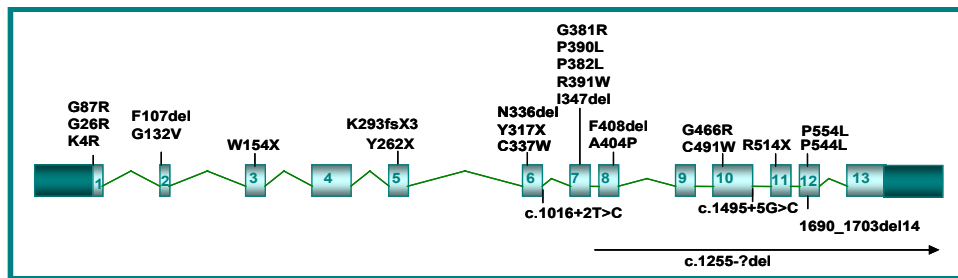


Fig. 7: Representación esquemática del gen SLC6A8 y su espectro mutacional

- **Gen GAMT**

Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 26 variantes nucleotídicas susceptibles de ser patogénicas en todo el mundo (Fig.10) (Dhar, et al., 2009; Mercimek-Mahmutoglu, et al., 2006; Verbruggen, et al., 2007; Vodopiutz, et al., 2007). Se han descrito 10 mutaciones de cambio de aminoácido, 4 son mutaciones sin sentido, 2 de splicing ,5 pequeñas inserciones, 1 gran inserción, 2 pequeñas deleciones, 1 gran deleción y 1 pequeña inserción-delección ([www.hgmd.cf.ac.uk/](http://www.hgmd.cf.ac.uk/)). La variante más común en la población caucásica es c.327G>A (18%) (Dhar, et al., 2009). También, se ha descrito la mutación c.59C>G como la más común en Portugal (35%) aunque el espectro mutacional identificado hasta el momento es muy heterogéneo (Almeida, et al., 2007). Se postula que ocurrió un efecto fundador en Portugal debido a la alta tasa encontrada de portadores (Mercimek-Mahmutoglu, et al., 2006; Mercimek-Mahmutoglu, et al., 2009).

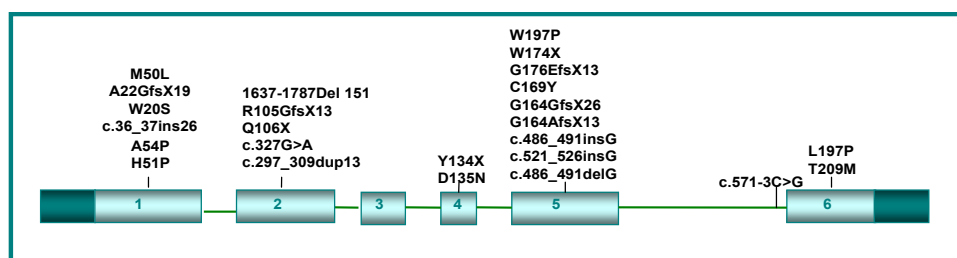


Fig. 8: Representación esquemática del gen GAMT y su espectro mutacional.

- **Gen AGAT**

En el gen AGAT se han descrito hasta el momento sólo 4 variaciones nucleotídicas patogénicas ([www.hgmd.cf.ac.uk/](http://www.hgmd.cf.ac.uk/)) (Fig.9). En una familia italiana se encontró la variación p.W149X (Battini, et al., 2002; Item, et al., 2001). En dos hermanas chinas se describió la mutación (IVS3+1G>T), que causa la exclusión del exón 3 (p.289\_484del196) (Johnston, et al., 2005), la mutación c.505C>T (p. R169X) en otros dos hermanos (Bai, et al, 2008) y en dos hermanos judíos yemenitas la inserción c.1111\_1112insA que causa un cambio de pauta de lectura (p.M371fs) (Edvardson, et al.,2010).

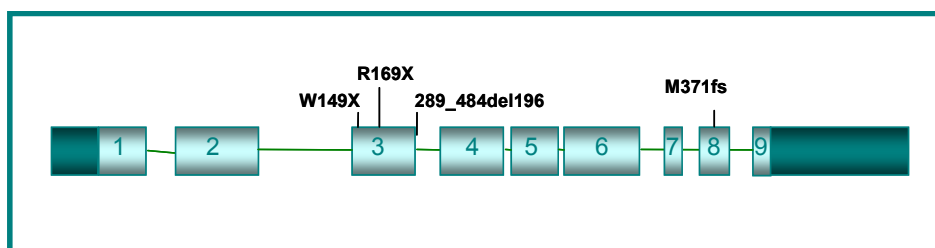


Fig. 9: Representación esquemática del gen AGAT y su espectro mutacional.

## 1.7 INTEGRACIÓN DE LAS VARIACIONES EN EL DNA, EXPRESIÓN GÉNICA Y FENOTIPO CLÍNICO

Al abordar una aproximación molecular en una enfermedad monogénica, se intenta valorar la posible patogenicidad de las mutaciones encontradas atendiendo al impacto que provocan sobre la función proteica e intentando correlacionarlo con el fenotipo clínico/bioquímico del paciente que las porta. Entre las variantes de secuencia identificadas en los tres genes implicados en la deficiencia de Cr existen algunos cambios que por su naturaleza; parada prematura, cambios en la fase de lectura o que causan alteraciones en el patrón de procesamiento del mRNA (*splicing*), podrían considerarse potencialmente dañinas, pero también hay otras de cambio de aminoácido, con un impacto funcional más difícil de interpretar. Aún cuando la relación genotipo-fenotipo suele ser más sencilla en pacientes homocigotos, hemocigotos (como es el caso de las mutaciones en el gen SLC6A8) o funcionalmente hemocigotos (portadores de una mutación PTC), que en pacientes heterocigotos para dos mutaciones de cambio de aminoácido, donde la correlación requeriría valorar la contribución de cada una de las variantes alélicas en la producción final de la proteína funcional, son numerosas las patologías en las que no se ha podido encontrar una correlación entre mutación y enfermedad (Nissim-Rafinia and Kerem, 2002). Todo ello ha llevado a explorar otros mecanismos genéticos que podrían contribuir a alterar la función

génica. Entre ellos los defectos asociados a procesos de *splicing* son los que tiene mayor relevancia en la práctica clínica.

Cada paso en la producción de un mRNA maduro supone un riesgo de introducir errores, por ello, entre los modificadores más importantes del fenotipo se encuentran los sistemas de procesamiento y control de calidad del mRNA. Aproximadamente un 15% de las mutaciones puntuales asociadas a enfermedades genéticas humanas afectan al correcto procesamiento del mRNA o *splicing* (Baralle, et al., 2009; Cooper, et al., 2006; Krawczak, et al., 1992; Wang, et al., 2005) y existe, normalmente, una relación inversa entre los niveles de transcritos normales que se generan y la gravedad de la enfermedad. Este proceso madurativo del mRNA es llevado a cabo por un complejo macromolecular denominado *spliceosoma* que reconoce secuencias exónicas e intrónicas para concluir eliminando los intrones de la secuencia que será traducida. Por tanto mutaciones que provocan alteraciones de *splicing* pueden afectar no sólo a los sitios constitutivos de *splicing* sino a secuencias implicadas en el reconocimiento de elementos reguladores. Estas secuencias reguladoras localizadas tanto en exones como en intrones pueden actuar bien estimulando la eliminación intrónica (potenciadores de *splicing* o *enhancers*) o bien impidiéndola (silenciadores de *splicing*). Los *enhancers* exónicos de *splicing* (ESEs) son sitios de unión de factores proteicos ricos en serina y arginina, conocidos como proteínas SR implicadas en el reconocimiento de los sitios 5' y 3' de *splicing* y en la comunicación entre ambos, en el reclutamiento y constitución del *spliceosoma* funcional y en el reconocimiento de *enhancers* (Pozzoli and Sironi, 2005). La identificación de las secuencias consenso de unión para estos factores reguladores de *splicing* (proteínas SR) ha permitido la generación de diferentes programas informáticos mediante los cuales se pueden predecir los posibles ESEs de una secuencia nucleotídica a estudiar.

Otro gran modulador del fenotipo clínico es el resultante del funcionamiento de los sistemas de vigilancia que se encargan de controlar la calidad del mRNA, y dentro de ellos el mejor estudiado es el NMD (*Nonsense-Mediated Decay*). El NMD detecta y degrada transcritos que contienen codones de parada prematura (PTCs) (Holbrook, et al., 2004), aunque también se conocen excepciones en casos de PTC que no son degradados (Thein, 2004). Los PTCs a su vez pueden ser el resultado de mutaciones sin sentido, cambios en la fase de lectura, procesamientos ineficientes, iniciaciones de traducción débiles o extensiones de la 3'UTR. Este mecanismo, conservado a través de la evolución, evita la acumulación de péptidos C-terminal truncados generados de forma rutinaria y también regula los niveles de apropiados de expresión. En ese sentido, el NMD puede ejercer un efecto beneficioso, neutro o perjudicial sobre el fenotipo de una enfermedad dependiendo de la localización del PTC en el transcrito y las propiedades de la proteína truncada degradada. En el caso de muchos PTC la proteína resultante puede ser no funcional y será degradada

sin un efecto perjudicial añadido al fenotipo de la enfermedad. En otros casos, el NMD actúa impidiendo la expresión de una proteína con potencial dominancia negativa y por tanto ejerce un efecto protector que beneficiaría a los portadores heterocigotos de PTC. El NMD puede también ser perjudicial y contribuir al fenotipo de una enfermedad al degradar y, por tanto, inhibir la expresión de proteínas con funcionalidad parcial (Holbrook, et al., 2004; Khajavi, et al., 2006).

Con todo esto queda claro que, para entender los efectos de los cambios genómicos en un sistema biológico, no basta con conocer el genoma, sino que también es necesario conocer la concentración de moléculas de RNA, es decir el transcriptoma. Sin embargo, cuanto más se sabe sobre las enfermedades monogénicas, más se las considera ejemplo inmejorable de las complejas interacciones entre genes y ambiente y más específicamente entre genes y nutrientes. Los defectos en la Cr cerebral, como el resto de las EMH implican la desregulación de rutas y redes metabólicas que controlan, entre otros, los procesos homeostáticos y de desarrollo, por lo que cualquier método diagnóstico basado sólo en herramientas moleculares, tendrá probablemente una capacidad limitada para correlacionar los hallazgos moleculares con los fenotipos. Es decir, tal como propone Lanpher, será también necesario conocer los efectos de los cambios genómicos sobre la cuantificación relativa de proteínas, es decir el proteoma, las propiedades de la proteína y sus interacciones, el interactoma, así como las concentraciones de metabolitos existentes, es decir el metaboloma (Lanpher, et al., 2006).

## **1.8 ESTRÉS CELULAR Y CREATINA**

Uno de los papeles más controvertidos y revisados de la Cr guarda relación con su potencial terapéutico en patologías neurológicas en las que asociado a una disfunción mitocondrial, se produce una alteración en el metabolismo energético celular (Andreassen, et al., 2001; Ferrante, et al., 2000). En estas situaciones, el estado energético juega un papel clave en la regulación e iniciación de los procesos necróticos y apoptóticos y el papel neuroprotector de la Cr parece asociarse, al menos parcialmente, a su capacidad para mejorar el déficit energético. Éste podría ser el caso de patologías neurodegenerativas como Parkinson o Alzheimer. En ambas patologías se propone que la disfunción mitocondrial y el daño oxidativo juegan papeles fundamentales en la patogénesis, y en ambos casos, se asocia la disfunción mitocondrial con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Meyer, et al., 2006).

- **Especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Las ROS se forman como subproducto del metabolismo normal del oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial y en condiciones metabólicas normales, juegan un papel esencial en las funciones celulares, incluyendo la transducción de señales para la proliferación. Para el buen funcionamiento del organismo, ha de existir un balance entre los eventos oxidativos y los sistemas de defensa corporales, manteniendo la homeostasis celular (Thannickal, 2009). Cuando este balance no se mantiene, ya sea por una disminución/pérdida total del sistema protector, por el aumento en la producción de ROS o por ambos eventos simultáneamente, se dice que el tejido está en un estado de estrés oxidativo que puede tener como resultado severas disfunciones metabólicas (Arakaki, et al., 1999).

Las mitocondrias son a la vez fuente y blanco de las ROS. En general los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno en la célula incluyen daño en el DNA y oxidación de proteínas y ácidos grasos, pero si el estrés oxidativo es severo, puede causar apoptosis, incluso necrosis (Lennon, et al., 1991).

Existe evidencia de la importancia de la Cr para la regulación de la cadena respiratoria, de hecho, se ha descrito un aumento en la actividad de la cadena respiratoria en fibroblastos de un paciente con deficiencia de GAMT, lo que sugiere que, en situaciones de depleción del sistema de energía a corto plazo basado en la proporción Cr/PCr, las células dependen casi exclusivamente del ATP generado en la mitocondria. Esto implica un estrés extra para la cadena respiratoria, aumentando la producción de ROS. Mientras que en algunos tejidos, como los fibroblastos, con bajos requerimientos de energía se puede compensar la ausencia de Cr/PCr mediante una regulación positiva de la cadena respiratoria, en otros como el cerebro, músculo o retina con altos requerimientos energéticos este sistema compensatorio se vería desbordado con el resultado de deficiencia en la cadena respiratoria (Das, et al., 2000). A pesar de la relación descrita entre la Cr, la deficiencia energética y el estrés oxidativo, hasta el momento no hay estudios de posible estrés oxidativo en estos defectos, por ello, la implementación del conocimiento en este campo podría ayudar a explicar los mecanismos fisiopatológicos de los síntomas neurológicos que sufren los pacientes con el síndrome de deficiencia de Cr cerebral.

- **Procesos apoptóticos**

Está muy documentado el hecho de que las ROS y la actividad mitocondrial juegan un papel muy importante en la inducción de la apoptosis bajo condiciones fisiológicas y

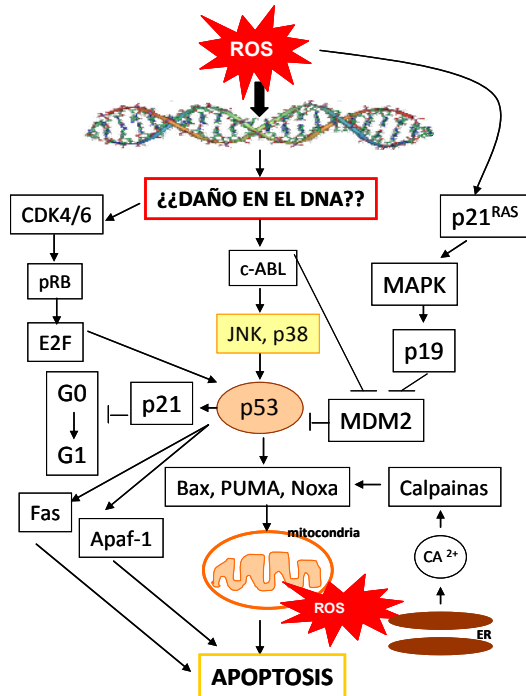


patológicas (Kim and Wong, 2009; Benhar, et al., 2002). Las ROS parecen tener un doble papel regulador de la apoptosis, puesto que altas concentraciones de ROS inducen procesos apoptóticos mientras que cantidades menores de ROS son reguladoras de procesos anti-apoptóticos (Circu and Aw, 2010; Simon, et al., 2000). La apoptosis celular es un proceso fisiológico, en la mayoría de los casos controlado genéticamente, en el que determinadas células dirigen su propia muerte en beneficio del organismo. Todas las células están programadas para destruirse por apoptosis, ya sea por haber realizado por completo sus funciones, porque hayan sufrido un daño en su material genético o porque les falten las señales que las mantengan en plena actividad funcional. La apoptosis está desencadenada por señales celulares que pueden originarse en la célula misma o proceder de la interacción con otras células. Importantes evidencias indican que la disfunción energética juega un papel que directa o indirectamente afecta tanto al envejecimiento normal como a la muerte celular en enfermedades neurodegenerativas y aunque hasta la fecha no existen pruebas irrefutables de que la apoptosis juegue un rol fundamental en las enfermedades neurológicas, si es sabido, que la muerte neuronal se encuentra anormalmente acelerada en pacientes con patologías neurológicas degenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Corea de Huntington, ELA y Parkinson, entre otras (Almeida, et al., 2008; Honig and Rosenberg, 2000; Mattson, 2000).

- **Rutas de señalización afectadas**

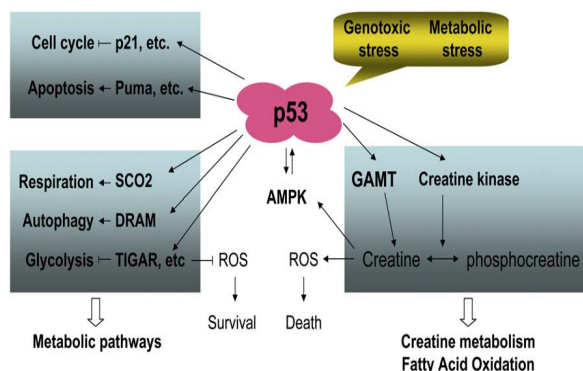
Las señales de estrés oxidativo activan rutas de las MAP kinasas que modulan la transcripción génica y están implicadas en la regulación de la proliferación, diferenciación, adaptación al estrés y apoptosis. Las MAP kinasas incluyen tres grandes subfamilias; las reguladoras de señales extracelulares (ERK), las c-Jun N-terminales (JNK) y las p38. Las tres son activadas por vías independientes pero pueden superponer sus cascadas de señalización (Chang and Karin, 2001). La proteína p53 constituye una diana potencial de rutas pro-apoptóticas ya que JNK y p38 son activadas por un exceso de ROS y fosforilan p53 estabilizándola (Buschmann, et al., 2001; Thornton and Rincon, 2009). Las ROS también pueden activar p53 directamente, modulando el estado redox de un residuo crítico de cisteína en el dominio de unión a DNA afectando su capacidad de unión a éste (Meplan, et al., 2000). A su vez, la activación de p53 induce el aumento de ROS, esta retroalimentación positiva podría ayudar a conseguir el umbral necesario de ROS para inducir la apoptosis en la célula (Johnson, et al., 1996). Además p53 inhibe la expresión de la superóxido dismutasa (SOD2) (Drane, et al., 2001), activa la transcripción de la glutatión peroxidasa (Tan, et al., 1999) y regula la progresión del ciclo celular a través de p21 (Somasundaram, et al., 1997). Por tanto la proteína p53 juega un papel esencial en la

regulación del estado redox celular y pequeños cambios en este estado pueden influir en sus respuestas biológicas dependiendo del tipo celular y la magnitud y duración del estrés y del daño sufrido por la célula (Ma, 2010) (Fig.10).



**Fig. 10: Rutas de señalización activadas por ROS.** Si las ROS causan un daño en el DNA se activan multitud de cascadas de señalización como por ejemplo p38 que activa p53 que tienen como consecuencia final la apoptosis. Figura modificada de: (Uzdensky, 2008)

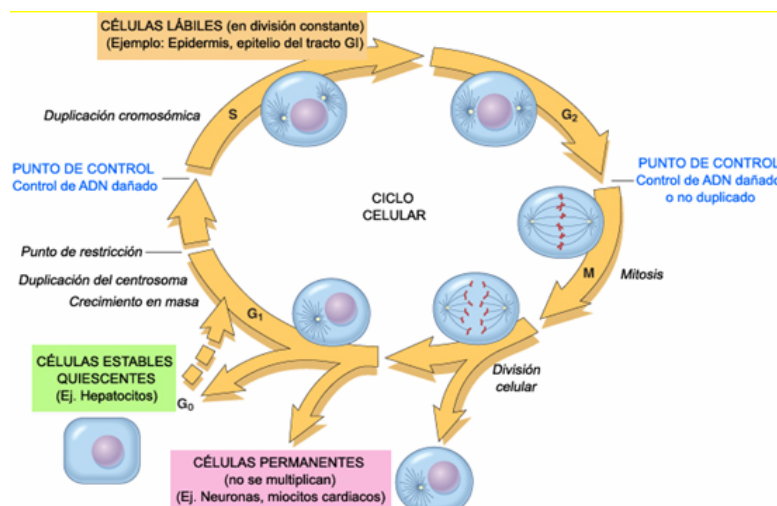
Recientes estudios postulan para la proteína supresora de tumores p53 un nuevo papel como regulador del metabolismo a través de la activación del gen GAMT (Vousden, 2010). Tanto el mRNA como los niveles de proteína GAMT se elevan de manera dependiente de p53 después del tratamiento con varios inductores de estrés genotóxico. También se ha identificado un sitio canónico de unión de p53 en el promotor de GAMT. La inhibición de GAMT mediante siRNA se correlaciona con una disminución de la apoptosis mediada por p53. GAMT sería por tanto un modulador de apoptosis y este papel resultaría crítico para la adaptación en respuesta al estrés causado por falta de nutrientes (Zhu and Prives, 2009) (Fig.11).



**Fig. 11: Interacciones de la proteína p53 con GAMT y con otras proteínas implicadas en apoptosis, regulación del ciclo celular etc.** Figura de (Vousden, 2010).

## • Alteración del ciclo celular

La división celular requiere energía para completarse correctamente (Jones, et al., 2005). En circunstancias normales el ciclo celular procede sin interrupciones. Sin embargo, si las células han sufrido algún daño en su DNA, el ciclo tiene la capacidad de detenerse temporalmente en las fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S o G<sub>2</sub>/M, reparar el daño si es posible y continuar. Cuando el daño es demasiado grave las células pueden sufrir un proceso programado de muerte celular y apoptosis o entrar en una fase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> irreversible, evitándose así la generación de células anormales (Shackelford, et al., 2000). En este proceso está implicado el supresor tumoral p53 que actúa como una proteína de punto de control y contribuye a la conservación y la estabilidad genética mediado bien por el arresto en G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> o la apoptosis en respuesta a daño en el DNA (Ceraline, et al., 1997; Di Leonardo, et al., 1994; Jin and Levine, 2001; Martindale and Holbrook, 2002). Si se opta por la apoptosis, tienen lugar procesos de senescencia y apoptosis con el fin de restringir el crecimiento de células aberrantes que han sufrido daño en su DNA (Haupt, et al., 2003). El funcionamiento correcto del ciclo y el paso de una fase a la siguiente está regulado también por multitud de enzimas del grupo de las quinasas (CDK), que están constituidas por subunidades reguladoras (ciclinas) y catalíticas (quinasas dependientes de ciclinas, o CDKs) (Thornton and Rincon, 2009) (Fig.12).



**Fig.12: Hitos del ciclo celular.** La figura muestra las fases del ciclo celular (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, M y G<sub>2</sub>), la localización del punto de restricción en G<sub>1</sub> y los puntos de control del ciclo celular en G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M. Figura modificada de Pollard TD y Earnshaw WC. Cell Biology.

Actualmente está ampliamente documentado el hecho de que la pérdida del control redox del ciclo celular puede dar lugar a una proliferación aberrante (Sarsour, et al., 2009). El efecto de las ROS sobre el crecimiento celular es complejo y no está suficientemente

estudiado, pero se conoce el hecho de que altos niveles de ROS tienen efectos directos sobre la desregulación de la expresión de las proteínas p53 y p21, que conlleva un arresto del ciclo celular (Chatterjee, et al., 2009). Lo que es más, el estrés oxidativo causa directamente daño en el DNA, que impide que las células puedan continuar su ciclo con normalidad (Pizarro, et al., 2009).

Por todo ello el objetivo de este trabajo ha sido integrar los datos bioquímicos, genéticos y el impacto de las variaciones nucleotídicas en los genes de la síntesis y el transporte de Cr sobre el metabolismo energético celular, para intentar entender la patogénesis de estas enfermedades.

## 2. OBJETIVOS





El **objetivo principal** ha sido profundizar en el conocimiento de las bases moleculares de las deficiencias de creatina cerebral así como en la evaluación del impacto de dichos defectos sobre el metabolismo energético celular. Para ello se han propuesto los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollo y optimización de técnicas para el diagnóstico de pacientes con deficiencia de creatina cerebral: Transporte de creatina en fibroblastos y análisis genético de los tres genes responsables de la patología
2. Análisis mutacional de pacientes con defectos de creatina cerebral: Identificación de mutaciones y estudios de *in vitro* e *in silico* de su posible patogenicidad.
3. Caracterización funcional de las mutaciones identificadas en los genes AGAT, GAMT y SLC6A8. Análisis de la expresión génica y de la proteína CRT1
4. Análisis del impacto de los defectos en creatina cerebral sobre el metabolismo energético celular: Estudios de estrés oxidativo, apoptosis, alteraciones en el correcto ciclo celular y posibles rutas de señalización afectadas
5. Estudio de la posible correlación genotipo-fenotipo en los pacientes





### 3. MATERIAL Y MÉTODOS





### **3.1 MATERIAL**

#### **3.1.1 Reactivos y aparatos**

Los reactivos químicos utilizados en este estudio fueron suministrados por: Amersham Pharmacia Biotech, SIGMA Aldrich, BiotechBio-Rad Laboratories, Cambrex, Difco Laboratorios, Fluka, GibcoBRL, Merck, Panreac Quimica, Perkin-Elmer, Pierce, Pronadisa, Promega, Sigma, Stratagene, Roche Diagnostics.

La agarosa y la agarosa NuSieve®GTG® son de las casas comerciales Pronadisa y Cambrex, y la acrilamida y bisacrilamida de Bio-Rad.

Invitrogen proporcionó los productos necesarios para la purificación de RNA total. La purificación de productos de PCR y de DNA plasmídico se llevó a cabo con los productos de las casas comerciales Promega, Quiagen y Mbiotech. Las firmas comerciales GENTRA Systems, Promega e Invitrogen proporcionaron los productos necesarios para la extracción de DNA genómico.

Los reactivos y enzimas empleados en las reacciones de PCR, RT-PCR fueron obtenidos de las firmas comerciales Invitrogen, Roche y Stratagene y se realizaron en un termociclador Verity de Applied Biosystem.

Las reacciones de secuenciación cíclica directa se llevaron a cabo con productos de Applied Biosystems en un secuenciador ABI Prism® 3730 de Applied Biosystems. Los oligonucleótidos sintéticos procedían de la firma comercial Isogen.

Las enzimas de restricción fueron proporcionadas por Roche Diagnostics y Promega. Invitrogen proporcionó los vectores necesarios para llevar a cabo los clonajes.

Los reactivos y aparatos empleados en las reacciones RT-PCR tiempo real (qRT-PCR) fueron obtenidos de las firmas comerciales Applied Biosystem.

En el cultivo celular se emplearon los siguientes reactivos: medio mínimo esencial de Eagle (MEM), glutamina de la firma comercial GibcoBRL y suero fetal bovino (FBS) de SIGMA. Los medios fueron preparados por el servicio de cultivo del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM). Los antibióticos fueron suministrados por Antibióticos S.A. La tripsina y los medios de comprobación se obtuvieron de Difco Laboratorios. Las botellas

de 75 ó 25 cm<sup>2</sup> y placas estandarizadas de 6 pocillos (P6) utilizadas para cultivo eran de NUNC, Thermo Scientific.

La [4-<sup>14</sup>C] creatina con actividad específica de 55mCi/mmol para la medida del transporte de creatina fue adquirida de American Radiolabeled Chemicals, y el líquido de centelleo Optiphase, “HiSafe” de Perkin Elmer. El conteo de radiaciones beta se realizó en un contador de centelleo *Wallac Rackbeta 1209 Liquid Scintillation Counter*.

Para los Western Blot se utilizó el sistema de transferencia a membrana de nitrocelulosa iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo en el XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) con buffer de electroforesis MOPS/SDS (Invitrogen). Los anticuerpos utilizados fueron proporcionados por Stressgen, Alpha Diagnostic y Santa Cruz Biothechnologies. Los Western blot se cuantificaron en un densitómetro Bio-Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer.

La citometría de flujo se realizó en los citómetros FACSCalibur™ y BD FACSCanto 111 (BDBioscience), y las sondas comerciales utilizadas fueron proporcionadas por Immunostep, Molecular Probes, Sigma y BD Pharmingen.

### **3.1.2 Material biológico**

#### **3.1.2.1 Muestras biológicas**

Este estudio incluye muestras biológicas (sangre total, biopsias de piel, fibroblastos de piel cultivados, sangre impregnada en papel y gDNA) de individuos con sospecha de CDS, pacientes confirmados con CDS, familiares de los mismos, e individuos sanos.

Las muestras biológicas para el estudio de una posible deficiencia de creatina cerebral procedían de pacientes identificados bien por los síntomas clínicos y <sup>1</sup>H-MRS alterado o bien durante la investigación de un posible error congénito del metabolismo en los siguientes centros pertenecientes al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER): Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares (CEDEM) de Madrid; Hospital Sant Joan de Deu de Barcelona e Instituto de Bioquímica Clínica (IBC) de Barcelona.

Las líneas de fibroblastos control fueron obtenidas del banco de células humanas del Instituto Coriell para la investigación biomédica (Candem, NJ). Las células elegidas

como controles fueron: GM-2784, GM-3348, GM-5381, GM-5400, GM-5756, GM-8333, GM-8398, GM-8680 y GM-9503.

Las líneas de fibroblastos de adultos control fueron obtenidas de la colección de muestras del CEDEM y sus edades se encontraban entre 18 y 80 años.

Los DNA's genómicos utilizados como control procedían del Human Random Control DNA Panel-1 HRC-1 (ECAA and Sigma-Aldrich) pertenecientes a donantes de sangre controles caucásicos.

Para el análisis genético así como para el estudio del transporte de Cr se utilizaron fibroblastos bien enviados directamente o bien obtenidos a partir de biopsia de piel y posteriormente cultivados como se describe en el apartado 3.2.2.

En aquellos casos en los que no se disponía de fibroblastos de piel se utilizó sangre total con anticoagulante conservada a -20°C o sangres impregnadas en papel e conservadas a temperatura ambiente para la extracción de DNA y posterior estudio genético. Los casos en los que se disponía de DNA genómico se utilizó éste directamente para su análisis.

Todo el material genético de pacientes, familiares e individuos sanos se obtuvieron con consentimiento informado autorizado por padres y por el hospital que remitió las muestras. Toda la investigación llevada a cabo con este material está autorizado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid, respeta los principios fundamentales de la declaración de Helsinki, del Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y de la declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos.

### **3.1.2.2 Cepas bacterianas, vectores plasmídicos y anticuerpos**

La estirpe de E.coli utilizada en este estudio ha sido XL1-Blue de Stratagene. Se utilizó el vector *pGem-T Easy Vector* (Promega).

Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de las distintas proteínas son: Rabbit Anti-Human Creatine transporter 1 (Alpha Diagnostic), Anti-Hsp60 SPA-829 (Stressgen), anti-p38 (N-20) sc-728 (Cell signaling), phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr 182) (Cell signaling) y anti-p53 (V31) (Bioworlde). Los anticuerpos secundarios son los

siguientes: anti-rabbit conjugado a peroxidasa (Santa Cruz) y anti-mouse conjugado a peroxidasa (Santa Cruz).

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Análisis de fluidos fisiológicos**

El análisis de los niveles de GAA y creatina en orina y plasma se realizó en el CEDEM por HPLC/MS-MS por dilución con isótopos estables ( $D^3$ -creatina y ácido [ $^{13}C_2$ ]-guanidinoacético) como ésteres de butilo en un cromatógrafo de líquidos (HPLC 1100, Agilent), acoplado a un espectrómetro de masas en tándem con trampa iónica lineal (QTrap, Applied Biosystems) y posterior separación en columna en modo isocrático (Bodamer, et al., 2001). El análisis por masas se realizó por MRM (multiple reaction monitoring) en modo positivo.

Una vez realizado el estudio bioquímico se seleccionaron los individuos que presentaron una relación Cr/Crn aumentada en orina y excreción anormalmente aumentada o disminuida de GAA.

### **3.2.2 Cultivo celular**

Los fibroblastos de piel de los pacientes y de controles se cultivaron en botellas de 75 ó 25 cm<sup>2</sup> o en placas estandarizadas de 6 pocillos a 37°C en una atmósfera de humedad relativa del 95% y CO<sub>2</sub> 5%. Se utilizó como medio de cultivo MEM suplementado al 10% con suero fetal bovino (FBS), glutamina 2mM, 100U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin. Se realizaron controles de contaminación de reactivos, medios de cultivo y cultivos celulares de forma sistemática durante todo el estudio. Las células fueron recogidas con una solución de tripsina 0,25% y EDTA 0,02% y sedimentadas mediante centrifugación. Para lavar las células se utilizó solución fosfato salina tamponada (PBS). Para conservación de las líneas celulares, éstas fueron congeladas en suero fetal con DMSO al 5% en nitrógeno líquido.

En todos los ensayos en los que los fibroblastos requirieron un tratamiento diferente al descrito previamente, las células se encontraban entre el 60-80% de confluencia.

Los ensayos de medida del transporte de creatina requerían la eliminación total de la creatina intracelular para ello se incubaron durante 48 horas las líneas celulares con MEM suplementado al 10% con FBS dializado (Sigma).

Para estudiar la inhibición del transporte de Cr se incubaron las células de los pacientes y controles con ácido  $\beta$ -guanidinopropiónico ( $\beta$ -GPA) 500 $\mu$ M y con creatina 5mM durante 2 horas.

Las incubaciones de las líneas de fibroblastos con antibióticos se realizaron en las siguientes condiciones: Puromicina (Sigma) 200  $\mu$ g/ml durante 5 horas, Emetina (Sigma) 100 $\mu$ g/ml durante 14 horas y Cicloheximida (Sigma) 500 $\mu$ g/ml durante 8 horas y Actinomicina (Sigma) 10  $\mu$ g/ml durante 1 hora.

Los estudios con ROS en células tratadas con oligomicina se realizaron incubando las células a una concentración de oligomicina (Sigma) 6 $\mu$ M durante 1 hora.

Para los estudios de análisis de ciclo celular las células fueron cultivadas durante 48 horas con MEM con FBS al 0,5%.

En todos los ensayos se ha intentado mantener el número de pases de las líneas celulares al mínimo posible, descartándolas cuando superaban los 12 pases.

### **3.2.3 Estudios de transporte de creatina**

La determinación del transporte de Cr en fibroblastos se ha llevado a cabo, utilizando como sustrato [4-<sup>14</sup>C] creatina 0,2 $\mu$ Ci/ml (Alcaide, et al., 2010) según el método de Daly y Seifter (Daly and Seifter, 1980). Las células se cultivaron a confluencia y se eliminó la Cr intracelular como se describe en el apartado 3.2.2. Posteriormente se incubaron durante 2 horas con cantidades crecientes de creatina a concentraciones crecientes (0-125 $\mu$ M) habiendo sido descritas como fisiológicas (20-30  $\mu$ M) (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000) y suprafisiológicas (500 $\mu$ M) y una cantidad fija de [4-<sup>14</sup>C] creatina. El transporte se detuvo aspirando el medio y lavando con PBS rápidamente a 4°C. Posteriormente se recogieron las células tripsinizando y solubilizándolas en 0,200 ml NaOH 0,5N a 4°C, 100  $\mu$ l fueron utilizados para cuantificar la creatina incorporada en 2,5 ml de líquido de centelleo (Optiphase, "HiSafe", Perkin Elmer) y los otros 100 $\mu$ l para determinar proteínas (Lowry, et al., 1951). Los resultados fueron expresados en pmoles de creatina por mg de proteína/2horas.

Con ligeras variaciones del protocolo se estudiaron distintas características del transporte de la creatina, como son:

- Linealidad respecto al tiempo de incubación
- Caracterización del transporte en fibroblastos controles.

- Inhibición del transporte por ácido  $\beta$ -guanidinopropiónico ( $\beta$ -GPA) que es un análogo estructural de la creatina, y por una alta concentración de creatina como se describe en el apartado 3.2.2.
- El cálculo de las constantes cinéticas se realizó mediante la representación de Hanes-Woolf  $[S]/v$  frente a  $[S]$  y que responde a la ecuación:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_m} [S] + \frac{K_M}{V_m}$$

Donde la pendiente =  $1/V_m$  y la ordenada =  $K_M/V_m$

### **3.2.4 Actividad GAMT**

La actividad GAMT se ha determinado en fibroblastos de pacientes mediante incubación con  $[^{13}\text{C}_2]$ -guanidinoacetato y  $[^2\text{H}_3]$ -S-adenosilmetionina en el Instituto de Bioquímica Clínica de Barcelona. El producto final de la reacción  $^{13}\text{C}_2$ - $^2\text{H}_3$ -Cr fue cuantificado por HPLC-MS/MS (Ilas, et al., 2000).

### **3.2.5 Aislamiento de ácidos nucleicos**

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de fibroblastos y sangre total mediante fenolizaciones (John, et al., 1991), y a partir de la sangre impregnada en papel con el kit *Generation DNA Purification Systems* (Gentra Systems). Algunas muestras de DNA genómico fueron extraídas con el aparato MagnaPure compact (Roche) con los protocolos de extracción de DNA bien de sangre total y de pellet de fibroblastos recomendados por la casa comercial.

La extracción de RNA total se llevó a cabo a partir de fibroblastos de piel cultivados utilizando el kit *Tripure Isolation Reagent* (Roche Applied Science) o con el aparato MagnaPure (Roche) con los protocolos de extracción de RNA para pellet de fibroblastos recomendado por la casa comercial.

### **3.2.6 Amplificación de ácidos nucleicos**

#### **3.2.6.1 Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**



Para la amplificación de DNA a partir de vectores plasmídicos y DNA genómico se utilizaron las enzimas *Platinum® Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) y *FastStart Taq* (Roche Applied Science) siguiendo las instrucciones de las casas comerciales. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystem).

Los oligonucleótidos para cada exón de todos los genes estudiados fueron diseñados de una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos y a unos 60pb de distancia de las regiones flanqueantes del intron de forma que se generaran amplicones de un tamaño que permitiese su secuenciación completa (Tablas 1, 2 y 3). Las PCR's fueron realizadas en un volumen final de 50µl, con una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 1,5 mM, 100 pmoles de cada oligonucleótido, 2,5 U de polimerasa y entre 0,5-1µg de DNA genómico. Las temperaturas de anillamiento fueron optimizadas para cada exón según fueran las temperaturas de fusión o *melting* del par de oligonucleótidos usados para cada amplicón y oscilan entre 58-60°C.

Todos los oligonucleótidos para amplificar los exones del gen SLC6A8 han sido diseñados basados en las secuencias disponibles en la base de datos pública NCBI (NT\_025965) y teniendo en cuenta la alta homología (80%) de este gen con SLC6A10 (NR\_003083) del cromosoma 16. Para ello se realizó un estudio comparativo de similitud de secuencia con la herramienta BLAST y se seleccionaron regiones que tuviesen al menos dos bases de diferencia con la secuencia de este gen. También se tuvo en cuenta su homología con otros transportadores que poseen una secuencia muy similar como por ejemplo el transportador de GABA/noradrenalina.

**Tabla 1: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los exones del gen SLC6A8**

NOMBRE DEL GEN	EXÓN	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)	TAMAÑO PCR
SLC6A8	1	1SB	atggcgaagaagagcgccgagaac	TM= 66,1	414 pb
		1B	gagcggcagcgccggacg	TM= 67,4	
	2	2A	ctggggcctgagtcagtggc	TM= 65,5	342 pb
		2B	ccaggcctgggtctcacgac	TM= 65,5	
	3	3A	ggacagatggtgggagcacg	TM= 63,5	468 pb
		3B	ggatggactgccaggcaac	TM= 61,0	
	4	4A	aagagggaccgctgaacc	TM= 61,0	420 pb
		4B	gcagggtggggagcattgc	TM= 63,1	
	5	5A	gcacttggccagggtctgc	TM= 62,8	420 pb
		5B	cacacctagagaagggccg	TM= 61,0	
	6-7	6A	tgctggtgcgtggagtgc	TM= 68,4	620pb
		7B	cggaaactgtcagattgtgg	TM= 57,9	
	8-9-10	8A	gcgcctctgaggcaggcg	TM= 65,1	760pb
		10B	tcagctcctgcggcgagg	TM= 62,8	
	11	11A	ggtgtacggtaggctatggc	TM=61,4	320pb
		11B	ccagcggctcgtagtacac	TM=61,8	
	12-13	13ABis	ttgtgtactacgagccgctgg	TM=61,8	745pb
		4ASB	ggaccagctcggctagggc	TM= 65,3	

El exón 1 del gen SLC6A8, debido a su alto contenido en G y C, ha requerido condiciones específicas de amplificación como oligonucleótidos de una longitud mayor de 20

nt, temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) de 67°C y la adición a la mezcla de PCR de “GC-rich solution” (Roche).

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de GAMT se basaron en la secuencia proporcionada por el NCBI (NT\_011255).

**Tabla 2: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los exones del gen GAMT**

NOMBRE DEL GEN	EXÓN	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)	TAMAÑO PCR
GAMT-1	1	E1A	agaggccgctcccggagc	65,1	450 pb
		1B2	gcactcccgtgaacgcc	62,8	
	2	E2A	cctcctccaggcagctctcc	63,1	320 pb
		E2B	cctcctccacctctgacagc	63,5	
	3	E3A	gctgtcagaggtggaggagg	63,5	280 pb
		E3B	ccgtgagcatgcccattccc	63,1	
	4	E4A	ctgggtgaggcgctgagc	62,8	200 pb
		E4B	gtgggtcaggacggaggtgg	63,1	
	5	E5A	gcacacacaccagtcaacttc	60,3	328 pb
		E5B	caaggtggctccagcagcagcc	63,1	
	6	E6A	cttgccatctgtaaacactcttc	58,9	504 pb
		1B	cactgccgactggccaagc	63,1	

Los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de AGAT se basaron en la secuencia proporcionada por el NCBI (NT\_010194).

**Tabla 3: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los exones del gen AGAT.**

NOMBRE DEL GEN	FRAGMENTO	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)	TAMAÑO PCR
AGAT	1	1A	cccaccacctgttcccggc	65,3	388pb
		1B	gacactctcgtgcaattccg	59,4	
	2	2A	ctgtaatcccactaccacc	59,4	565pb
		2B	ggaaggaagcaattatcattgg	56,5	
	3	3A	tgctcaatgctaggatcag	57,3	502pb
		3B	caacatggaccaaacattcc	57,9	
	4	4A	cagcgtgctcttgaagagg	58,8	580pb
		4B	cccaggaccagaagaagg	61	
	5-6	5A	gaccgctcttcccagg	61	772pb
		6B	gccataaggaatcaatgtttg	56,5	
	7-8	7A2	gacaattattactgataaggg	58	1250pb
		8B	gcactccaactgttgggg	59,4	
	9	9A	cttaaggattagaaccacagg	55,9	874pb
		9AS	gcataatcacatgttgagatg	55,3	

### 3.2.6.2 Amplificación de cDNA mediante transcripción reversa del mRNA y posterior reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Las reacciones de RT-PCR para su conversión en cDNA (1µg de RNA total) se realizaron con el kit SuperScriptIII (Invitrogén) con las condiciones descritas por la casa comercial. Para la amplificación del cDNA, las condiciones de PCR fueron similares a las descritas en el apartado anterior añadiendo de 200-500ng de cDNA. El diseño de los oligonucleótidos se realizó de manera que se generaran amplicones parcialmente solapantes y que cumplieran idénticos requisitos que los diseñados para la amplificación exónica, siempre basándonos en las secuencias disponibles en las bases públicas para SLC6A8 (NM\_005629.3) (Tabla 4).

Tabla 4: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del cDNA del gen SLC6A8

NOMBRE DEL GEN	FRAGMENTO	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	Tm (°C)	TAMAÑO PCR
SLC6A8 cDNA	F1	1SB	atggcgaagaagagcgccgagaac	TM= 66,1	473pb
		1AS	ctccgccgttctttagcac	TM= 61,4	
	F2	2S	gcgcgagacctggacgcg	TM= 65,1	480pb
		2AS	gacttggtctccagaactcg	TM= 60,3	
	F3	3S	caacctcacctgtgaccagc	TM= 61,4	712pb
		3AS	ggaagtagtaggaggccgg	TM= 61,0	
	F4	4S	tcatgctgttgctgctggtc	TM= 59,8	808pb
		4AS	cactcatggtgctttctccc	TM= 59,4	
	COMPL	1SB	atggcgaagaagagcgccgagaac	TM= 66,1	2025pb
		4AS	cactcatggtgctttctccc	TM= 59,4	

En la Tabla 5 se muestran los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR diseñados a partir de las secuencias públicas del NCBI y correspondientes al cDNA del gen GAMT-1 (NM\_000156.4). Para la amplificación del cDNA del gen GAMT diseñamos oligonucleótidos con el fin de amplificarlo en dos fragmentos solapantes, teniendo en cuenta su región homologa con la isoforma GAMT-2 (NM\_138924.1). Del mismo modo se ha amplificado el cDNA completo.

Tabla 5: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del cDNA del gen GAMT

GEN	FRAGMENTO	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	Tm (°C)	TAMAÑO PCR
GAMT cDNA	F1	1S	gcgatcgaggtcgggctcg	TM= 62,8	622 pb
		1AS	cgcgggcacctgcgtctc	TM= 65,1	
	F2	2S	tcacctactgcaacctcacc	TM= 59,4	443 pb
		2AS (1B)	cactgccgactggccaagc	TM= 63,1	
	COMPL	1S	gcgatcgaggtcgggctcg	TM= 62,8	1010pb
		2AS (1B)	cactgccgactggccaagc	TM= 63,1	

Para la amplificación del cDNA del gen AGAT los oligonucleótidos fueron diseñados según la secuencia proporcionada por el NCBI (NM\_001482.2).

**Tabla 6: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del cDNA del gen AGAT**

GEN	FRAGMENTO	NOMBRE OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	T <sub>m</sub> (°C)	TAMAÑO PCR
AGAT cDNA	1	1S-2	gaccgacgcggcccagagg	76	920 pb
		2as	ctggagcaagatgcctacgc	67	
	2	3S	gtagaagacagacacaaattgg	57,8	1495 pb
		4AS	catcgcattaggtttacctcc	64,2	
	3	3S	gtagaagacagacacaaattgg	57,8	1232 pb
		9AS	gcatatatcacaatgttgagatg	55,3	

### **3.2.7 Purificación de DNA**

La purificación de productos de PCR se llevó a cabo teniendo en cuenta el tamaño del fragmento y la calidad de la amplificación. Para fragmentos de tamaño pequeño en los que se visualizaba una banda única al ser cargado el producto de PCR en un gel de agarosa se utilizó el sistema *SpinClean PCR Purification Kit* (Messenger Biotechnology). Sin embargo, para fragmentos de un tamaño superior a 800pb o que presentaban varias bandas al cargar el producto de PCR en un gel se procedió a recortar la banda que corresponde al tamaño adecuado tomando como referencia el marcador de peso molecular y se utilizó kit *QIAEX® II Gel Extraction kit* (Qiagen).

Para purificar DNA plasmídico se empleó *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). La extracción de DNA plasmídico a gran escala se llevó a cabo con el producto *QIAfilter Plasmid Maxi kit* (Qiagen) según se requería para cada ensayo.

### **3.2.8 Electroforesis y cuantificación de ácidos nucleicos**

La cuantificación y el análisis de la calidad del DNA plasmídico, DNA genómico y RNA total se realizó con Nanodrop ND-1000 (Termo Scientific) y el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent).

La separación de fragmentos de DNA, DNA plasmídico y DNA genómico total se realizó en geles de agarosa a distinta concentración (0.8%-1.6%) según el rango de separación requerido. La agarosa *nusieve* (3% de agarosa) de Pronadisa fue utilizada en los casos donde fue necesario una mayor resolución de las bandas. Las electroforesis se llevaron

a cabo en cubetas de desarrollo horizontal, empleando el tampón TAE (40mM Tris-Acetato, 2mM EDTA). La visualización del DNA se realizó mediante tinción de los geles con bromuro de etidio, y la identificación del tamaño de las bandas obtenidas por comparación con marcadores de peso molecular conocido *DNA Molecular Weight Marker V, II y Ø29* (Roche).

### **3.2.9 Secuenciación**

Las reacciones de secuenciación cíclica directa se llevaron a cabo utilizando el kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* de Applied Biosystems siguiendo el protocolo suministrado por el proveedor, y los productos obtenidos fueron resueltos en un secuenciador automático ABI Prism 3730 por electroforesis capilar de Applied Biosystems.

### **3.2.10 Análisis de mutaciones y nomenclatura**

Inicialmente el estudio molecular de los genes SLC6A8, GAMT y AGAT se llevó a cabo a nivel de mRNA mediante retrotranscripción y posterior amplificación por PCR a partir de RNA total. Una vez fueron detectados los cambios nucleotídicos en el cDNA de los pacientes, el análisis molecular del gen a nivel de DNA genómico permitió identificar y confirmar la presencia de los variantes alélicas en los exones correspondientes, así como determinar el carácter homocigoto o heterocigoto del paciente para dicha mutación. En todos los pacientes en los que se encontraron variantes alélicas, se ha completado el estudio, confirmando la herencia en los padres.

Todas las variantes alélicas encontradas se han denominado de acuerdo con Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>) y utilizando las secuencias disponibles de los tres genes en la base pública NCBI. En el nombre sistemático, la posición del nucleótido aparece primero, luego el cambio producido y se comienza con una **g** minúscula si se trata del DNA genómico o una **c** minúscula para indicar que se trata de la numeración del cDNA es decir, la secuencia codificante, complementaria al mRNA designando como nucleótido 1 la A del codón de iniciación ATG de la cadena polipeptídica. En el caso de mutaciones sin sentido o *nonsense*, el codón de parada se designa con una X. Para inserciones o deleciones se utilizan las abreviaturas *ins* y *del*, respectivamente y en el nombre común se incluye las siglas *fs*, si produce un cambio en la fase de lectura (*frameshift*). En el caso de sustituciones de aminoácidos se utiliza normalmente el código de una letra para éstos, apareciendo primero el código del aminoácido que cambia, la posición y el aminoácido mutante con una **p** minúscula delante para indicar que se trata de la nomenclatura a nivel de proteína.

### **3.2.11 Cuantificación de la expresión génica mediante qRT-PCR**

Se han cuantificado los niveles de mRNA de los genes relacionados con el metabolismo de la creatina, SLC6A8, GAMT y AGAT en fibroblastos de pacientes e individuos controles del rango de edad adecuados para cada paciente.

La extracción de RNA y la RT-PCR se realizó según se describe en el apartado 3.2.5. Se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados con el software ProbeFinder (Roche Applied Science, Universal Probe Library) y se analizaron los transcritos generados mediante PCR cuantitativa. Los primers utilizados son:

gen SLC6A8: 5'agctgacccttgtctggtg 3' y 5' agtaggggaatgtagcagtga 3'

gen GAMT: 5'tgaccgaccatgtcacca 3' y 5' ggatgatcgtctgggtga 3'

gen AGAT: 5'cccaccacctgttcccggc 3'y 3'gcataatcacaatgttgagatg 5'

Los datos han sido estandarizados respecto a los genes de expresión constitutiva Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) y beta-glucoronidasa (GUSB), y tras comprobar que no existían diferencias significativas entre ambas expresiones se eligió el gen GAPDH para realizar el tratamiento matemático.

Para el estudio del efecto de los agentes de parada de traducción sobre la expresión del gen se cuantificaron los niveles de mRNA en los fibroblastos tratados con Emetina, Puromicina y Cicloheximida según se describe en el apartado 3.2.2.

Para el estudio de estabilidad de los mRNA's se incubaron las células con Actinomicina y Emetina según se describe en el apartado 3.2.2.

En todos los casos los datos fueron analizados utilizando el software SDS suministrado por Applied Biosystems. Este software calcula los valores del ciclo umbral o *cycle threshold* (Ct) para cada muestra y un control interno (GAPDH) que es el número del ciclo de amplificación de la PCR en la que se detectó por primera vez el producto. La cantidad de producto es proporcional al número de moléculas de RNA/DNA iniciales, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen el producto fluorescente aparecerá en ciclos anteriores.

Una vez obtenidos los valores de Ct se usó el método del  $\Delta\Delta Ct$  para obtener finalmente el parámetro RQ (*relative quantity*) que permite calcular y comparar la cantidad de mRNA en los distintos extractos celulares, siendo calculado según la siguiente fórmula:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}; \Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ de muestra problema} - \Delta Ct \text{ de muestra de referencia})$$

$$\Delta Ct = (Ct \text{ del gen de estudio} - Ct \text{ del gen constitutivo [GAPDH o GUSB]})$$

### 3.2.12 Clonaje de cDNA

Los fragmentos producto de PCR que se quieren clonar se introducen directamente en el vector pGem-T Easy Vector (Promega) con el kit de ligación rápida específico para este vector *Rapid Ligation for the pGem-T Easy Vector* (Promega).

Se transformaron las células XLI-Blue (Stratagene) con el vector conteniendo los distintos fragmentos de cDNA. La selección de los clones positivos se hizo en placas LB con ampicilina (0.1 mg/ml), utilizando IPTG y X-gal. La purificación de DNA plasmídico se llevó a cabo mediante el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega) y posteriormente fueron secuenciados como se describe en el apartado 3.2.9.

### 3.2.13 Ensayos de ROS y apoptosis

La **viabilidad celular** se determinó con tinción con ioduro de propidio (IP 0,001%; Sigma-Aldrich). Las células fueron incubadas con IP a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml durante 15 minutos en oscuridad antes del análisis.

Los **análisis por citometría de flujo** se realizaron en un citómetro de flujo BD FACSCalibur™ (BDBioscience). Las células fueron plaqueadas a una densidad de 300.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y crecidas durante 24 horas según las condiciones de cultivo descritas en el apartado 3.2.2. En ambos estudios se midieron al menos 10.000 eventos por muestra, cada línea celular se ensayó al menos 2 veces y cada muestra se midió por triplicado en cada ensayo. Los datos obtenidos fueron adquiridos y analizados con los programas informático Cell Quest-Pro y FlowJo Versión 6.4.2 (Becton Dickinson) respectivamente.

La producción celular de **especies reactivas de oxígeno (ROS)** se monitorizó en fibroblastos de pacientes y controles mediante citometría de flujo utilizando la sonda diacetato 2-,7-diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) (Molecular Probes, eugene, OR, USA) durante 30 min. Esta molécula es permeable para las células. Luego, en el citoplasma las

esterasas hidrolizan su enlace éster convirtiéndola en una sustancia hidrófoba H<sub>2</sub>DCF (Diclorofluoresceína) incapaz de escapar del compartimento citosólico. El H<sub>2</sub>DCF es una molécula fluorescente y su emisión es directamente proporcional a la cantidad de ROS presente. Las células son marcadas también con IP (Ioduro de propidio) que es impermeable para las células sanas pero es capaz de atravesar la membrana de células comprometidas y marcar el DNA tanto de células necróticas como apoptóticas tardías permitiendo así diferenciarlas. Los resultados se expresan como un ratio de la fluorescencia de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA de línea celular de cada paciente con respecto al control.

Los **niveles de anexina V** como marcador apoptótico se monitorizaron en fibroblastos de pacientes y controles mediante citometría de flujo utilizando el kit comercial *Annexin V-DY634 Apoptosis Detection Kit* (Inmunostep) respectivamente. Se trataron algunos pocillos de células control con estaurosporina 2μM para inducir apoptosis y usarlos como control positivo. Posteriormente las células fueron e incubadas con 2,5μl Anexina V y 5μl de IP en 100μl de “*binding buffer*” durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Los resultados se expresan como una razón de la fluorescencia de la sonda Anexina V de la línea celular de cada paciente con respecto al control y como porcentaje de células que presentan tinción con esta sonda.

### **3.2.14 Medida del contenido de DNA. Análisis de ciclo celular**

El análisis de ciclo celular en las líneas de pacientes y de controles se realizó mediante citometría de flujo. Se plaquearon 1,5 millones de células y se cultivaron durante 48 horas en medio con FBS al 0,5% para sincronizar su crecimiento (Kues, et al., 2000; Nishikiori, et al., 2008) y posteriormente 24 horas en MEM con FBS al 10%. Se fijaron en 1 ml de etanol 70% frío durante al menos 18 horas a -20°C. A continuación se incubó el pellet con 0,5ml de tampón de ciclo (PI/RNase Staining Buffer, BD Pharmingen) 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Las células apoptóticas poseen un menor contenido de DNA y por tanto pueden ser detectadas con tinciones de DNA como poblaciones que muestran menor intensidad de la señal (fase sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>).

El citómetro de flujo usado fue el BD FACSCanto 111 (BDBioscience). Se midieron al menos 10.000 eventos celulares por muestra, cada línea se ensayó al menos dos veces y cada muestra se midió por triplicado en cada ensayo. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa de análisis informático Mod Fit LT v2 (Verity Software House para Windows).



### **3.2.15 Extracción de proteína, electroforesis, transferencia e inmunodetección de las proteínas (Western blot)**

Para la realización de *Western Blot*, los pellets obtenidos tras crecer los fibroblastos de piel de pacientes fueron recogidos mediante raspado en un buffer de lisis que contiene Tritón X-100 a una concentración final del 1%, Glicerol al 10%, Na Cl 150mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.5 e inhibidor de proteasas *Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* (Roche Applied Science). La determinación de la concentración de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad). Las muestras fueron preparadas con el tampón *NuPAGE LDS 4X LDS Sample Buffer* (Invitrogen) con DTT 1mM. La misma cantidad de extracto (20 µg prot) fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%. La electroforesis se llevó a cabo en el XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) con tampón de electroforesis MOPS/SDS (Invitrogen) a un voltaje de 200V.

La proteínas fueron transferidas del gel a la membrana de nitrocelulosa con el *iBlot® Dry Blotting System* (Invitrogen) y detectadas mediante tinción con Rojo Ponceau (Harlow and Lane, 1988). Para determinar el peso molecular de la proteína estudiada se usó el marcador *Novex® Sharp Protein Standard* (Invitrogen).

Para revelar se usó el reactivo ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech) excepto para revelar la proteína SLC6A8 que se utilizó el kit *SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Termo Scientific).

La cuantificación de los niveles de proteína inmunorreactiva se realizó mediante densitometría láser, utilizando el densitómetro *Bio-Rad GS-710 Calibrated Imaging Densitometer* (Bio-Rad).

### **3.2.16 Medida de creatina intracelular**

Las células de los pacientes y controles fueron cultivadas a confluencia, posteriormente fueron lavadas, recogidas mediante tripsinización, y el pellet fue congelado a -80°C. Se resuspendieron los pellets en 0,2 ml de PBS, se congelaron y descongelaron 3 veces en nitrógeno líquido para posteriormente ser centrifugadas 5 minutos a 14.500xg. Una alícuota del sobrenadante se usó para la cuantificación de creatina intracelular por HPLC/MS/MS con isótopos de creatina estables como control interno, y otra para la determinación de proteínas mediante el método de Lowry. La concentración de creatina se expresó como pmol/µg de proteína.

### **3.2.17 Soporte informático**

Las secuencias tanto de los cDNAs como de los DNAs genómicos de los genes SLC6A8, GAMT y AGAT fueron obtenidas mediante búsqueda informática en las bases de datos pública Ensemble (<http://www.ensembl.org/index.html>) y GenBank de NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov/>). Las secuencias de las proteínas se obtuvieron en PDB (*Protein Data Bank*) de SWISS-PROT (<http://www.expasy.org/sprot/>).

Para la búsqueda de secuencias homólogas en las bases de datos públicas se utilizaron programas de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

El alineamiento interespecífico de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ortólogas y parálogas se realizó con el programa CLUSTALW de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

La identificación de las mutaciones detectadas en los genes como posibles ESEs (*exonic splicing enhancers*) se llevó a cabo con el programa informático ESEfinder versión 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE/>) (Cartegni and Krainer, 2003) y HSFinder v2.4 (<http://www.umd.be/HSF/>) (Desmet, et al., 2009).

Para la predicción de la posible patogenicidad y el efecto funcional de las variaciones nucleotídicas de cambio de aminoácido se usó el software de predicción informática PolyPhen (Polymorphism Phenotyping) (Bork Goup) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>).

El procesamiento y análisis de secuencias de DNA se llevó a cabo con el programa Chromas 1.45 (Griffith University, Australia).

Los datos obtenidos del citómetro de flujo fueron analizados con el programa de análisis informático FlowJo Versión 6.4.2 (Mac) y el análisis de los datos con los programas FACSDIVA 6.1.1, CellQuestPro y Mod Fit v2.0.

### **3.2.18 Análisis estadístico**

Todos los p-valores se han estimado mediante la prueba estadística de la t de Student con dos colas y con varianzas entre los diferentes grupos analizados diferentes realizada en Microsoft Office Excel 2003. Se han considerado significativas las diferencias que poseían p-valores del 5% o menores.

## 4. RESULTADOS

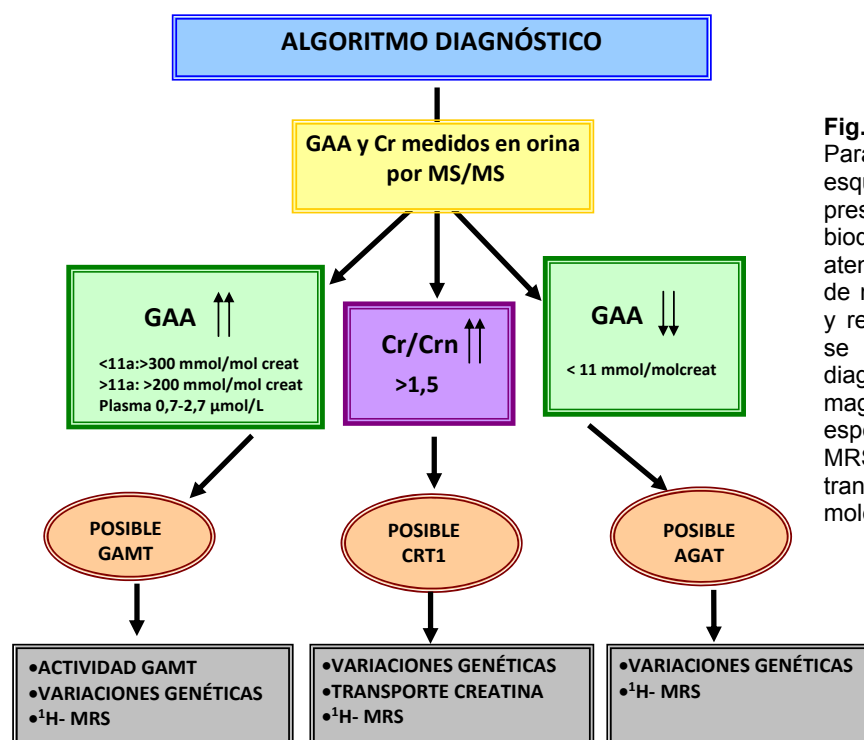




## 4.1 SELECCIÓN DE PACIENTES

Durante el transcurso de este trabajo, en el CEDEM se han determinado los niveles de ácido guanidinoacético y creatina en orina de más de cinco mil pacientes con sospecha de enfermedad metabólica y se seleccionaron aquellos casos que presentaron una relación creatina/creatinina aumentada en orina o niveles anormalmente aumentados o disminuidos de GAA en orina y plasma. Gracias a este cribado y al realizado por el Hospital Sant Joan de Deu e Instituto de Bioquímica Clínica (IBC) de Barcelona, se preseleccionaron **17** casos con sospecha de deficiencia del transportador CRT1 por presentar la relación Cr/Crn aumentada, **4** con sospecha de deficiencia de GAMT por presentar niveles aumentados de GAA en fluidos fisiológicos y **4** con sospecha de deficiencia en AGAT por presentar niveles disminuidos de GAA. Los valores de corte establecidos para la preselección de los posibles pacientes con CDS se indican en la Figura13.

Una vez seleccionados los individuos a estudiar, el plan de trabajo establecido para completar su diagnóstico se ejecutó siguiendo el algoritmo diagnóstico que se muestra a continuación (Fig. 13):



**Fig.13: Algoritmo diagnóstico.** Para discriminar posibles el esquema de trabajo incluyó una preselección y clasificación bioquímica de los pacientes atendiendo a las concentraciones de metabolitos diagnósticos; GAA y relación Cr/Crn. Posteriormente se realizó la confirmación del diagnóstico con una resonancia magnética cerebral con espectroscopia de protones ( $^1\text{H}$ -MRS), estudios enzimáticos o de transporte de Cr y análisis molecular.

En las Tablas 1 y 2 se muestran los pacientes que tras ser preseleccionados por presentar alteraciones bioquímicas finalmente fueron confirmados como pacientes de CDS y con los que se continuaron los estudios (seis con defecto en CRT1 y tres en GAMT). En las Tablas A, B y C del Anexo se muestran los otros 8 individuos que finalmente no fueron confirmados como pacientes CDS con sus datos bioquímicos y su historial clínico.

Tabla 1: Pacientes confirmados con deficiencia en el transporte de Cr

Pac	GAA VN: 13-139 <11a VN: 12-100 >12a mmol/mol creat	Cr VN: 12-9500 μmol/l	Cr/Crn VN: <1,5	Historial clínico
P-1	87	-----	3,2; 4,9	Varón 11 años, retraso psicomotor, comportamiento autista y epilepsia. Ausencia señal de creatina en <sup>1</sup> H-MRS.
P-2	99; 101	-----	4,42; 3,7	Varón 3 años, retraso psicomotor, convulsiones, ausencia lenguaje. Ausencia señal de creatina en <sup>1</sup> H-MRS.
P-3	64	-----	3,0	Varón 40 años, retraso mental severo, comportamiento autista, epilepsia refractaria. Ausencia de lenguaje verbal. Un hermano afectado. Disminución señal creatina en <sup>1</sup> H-MRS.
P-4	89-152	9236-15351	2,09 ; 3,28	Varón 4 años, retraso psicomotor leve, marcha torpe, retraso lenguaje. Tío materno con crisis convulsivas y CI bajo. Disminución señal creatina en <sup>1</sup> H-MRS.
P-5	-----	-----	1,9; 2,7	Varón 16 años, retraso mental, convulsiones y autismo. Ausencia señal creatina en <sup>1</sup> H-MRS.
P-6	-----	-----	2,4; 4,1	Varón 8 años, trastorno generalizado del desarrollo, distonías, ausencia de lenguaje, epilepsia.

Pac: Pacientes , VN: valores normales. P-3 (Sempere, et al., 2009a), P-4 (Alcaide, et al. 2010), <sup>1</sup>H-MRS: Resonancia magnética con espectroscopía de protones.

Tabla 2: Pacientes confirmados con deficiencia de GAMT

Pac	GAA VN: 13-139 (<11a) VN: 12-100(>12a) mmol/mol creat	Plasma GAA NV: 1.2-3.6 μmol/L	Actividad GAMT* pmol/h/mg prot	Historial clínico
P-7	228	11	2,8	Mujer 23 años. Retraso mental severo, corea y ataques epilépticos. Disminución señal creatina en <sup>1</sup> H-MRS.
P-8	201	12	3,7	Mujer 12 años. Retraso mental grave, epilepsia mioclónica refractaria, comportamiento autista. Ausencia señal creatina en <sup>1</sup> H-MRS.
P-9	374	18	4,1	Varón 47 años. Retraso mental severo, crisis epilépticas y comportamiento autista. Disminución señal creatina en <sup>1</sup> H-MRS.

Pac: Pacientes, VN: valores normales \* La actividad GAMT en fibroblastos control (n:6): 100-195 pmol/h.mg proteína. Paciente 7: P11 en (Item, et al., 2004); P-1 en (Sempere, et al., 2009b), Paciente 8: P-2 en (Sempere, et al., 2009b) y Paciente 9: P3 en (Sempere, et al., 2009b). <sup>1</sup>H-MRS: Resonancia magnética con espectroscopía de protones.

## 4.2 TRANSPORTE DE CREATINA

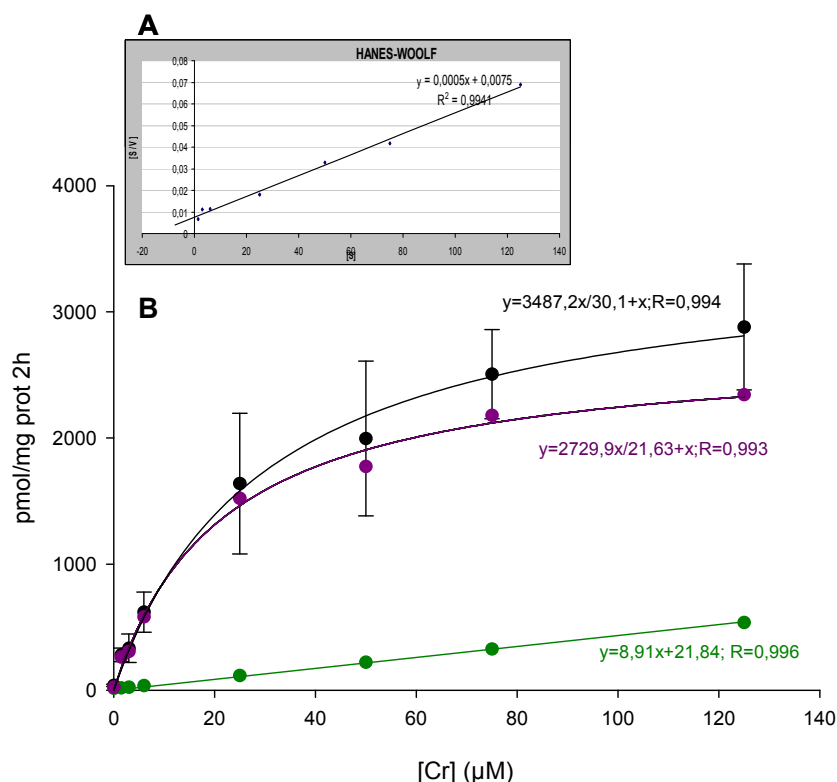
Siguiendo el algoritmo diagnóstico establecido, el primer paso en nuestro plan de trabajo fue la caracterización del transporte de Cr en fibroblastos de aquellos pacientes con la relación Cr/Crn aumentada en orina. Para ello, se caracterizó el transporte de Cr en fibroblastos control a concentraciones fisiológicas y suprafisiológicas utilizando  $[4-^{14}\text{C}]$  creatina como sustrato. Las concentraciones descritas como fisiológicas en plasma son 20–30  $\mu\text{M}$  (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). En este estudio se incluyeron 8 líneas de fibroblastos control.

Previo al análisis de las constantes cinéticas, se analizaron parámetros como linealidad del transporte con respecto al tiempo de incubación, y a la cantidad de proteína, estableciendo con ello las condiciones óptimas para trabajar a velocidades iniciales. Asimismo se estudió el efecto de análogos estructurales como el guanidinopropionato.

### 4.2.1 Medida de transporte de creatina en fibroblastos control

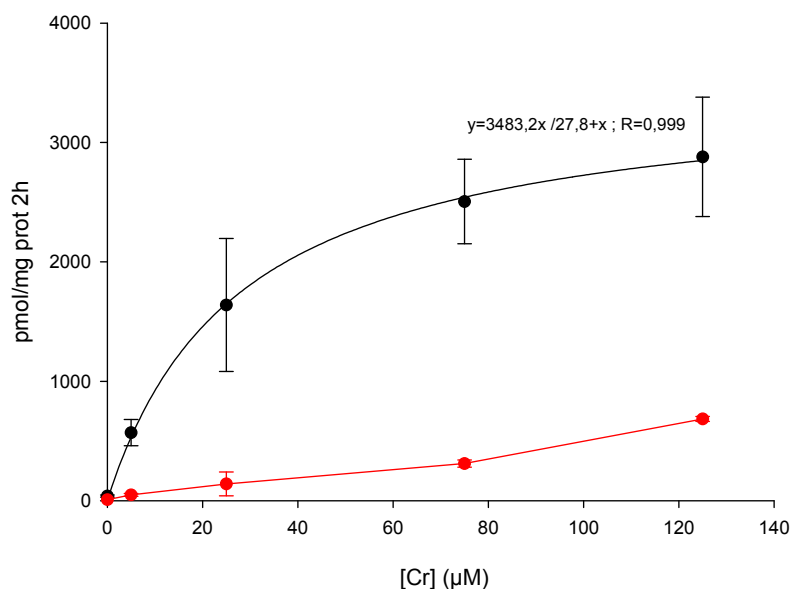
Tras confirmar la linealidad del transporte de Cr entre 30 y 120 minutos en un rango de concentraciones crecientes de Cr (0-125 $\mu\text{M}$ ) (datos no mostrados), se estudió el efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de transporte. El perfil obtenido presentaba tendencia a la saturación y el componente inespecífico o difusión pasiva se determinó inhibiendo el transporte total con Cr 5mM. En estas condiciones, la acumulación intracelular de Cr debida al componente inespecífico se ajustaba a una recta de regresión lineal. El componente específico del transporte se calculó sustrayendo al total el inespecífico así determinado (Fig.14).

Para calcular los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) del transporte específico de Cr en la media de 8 líneas de fibroblastos controles se usó la representación de Hanes-Woolf. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:  $K_m=15\pm3\mu\text{M}$  y la  $V_{max}=2000\pm85$  pmol/mg prot/2h (Fig.14).



**Fig.14: Transporte de Cr en fibroblastos control.** Los datos corresponden a la media de 8 líneas celulares control medidas en 8 experimentos independientes y cada medida realizada por duplicado. **A)** Cálculo de las constantes cinéticas **B)** Transporte total (negro), transporte inespecífico o difusión (verde), transporte específico (morado). La gráfica de transporte total se pudo ajustar con un elevado coeficiente de regresión a una hipérbola cuadrática de dos parámetros

Los estudios del efecto sobre el transporte del análogo estructural de la Cr, el ácido guanidinopropiónico (GPA) 500 $\mu\text{M}$  mostraron una clara reducción del transporte (8,5% a Cr 25 $\mu\text{M}$ ) y un comportamiento característico de un inhibidor competitivo, como se puede ver en la Figura 15 confirmando así la especificidad del transporte estudiado.

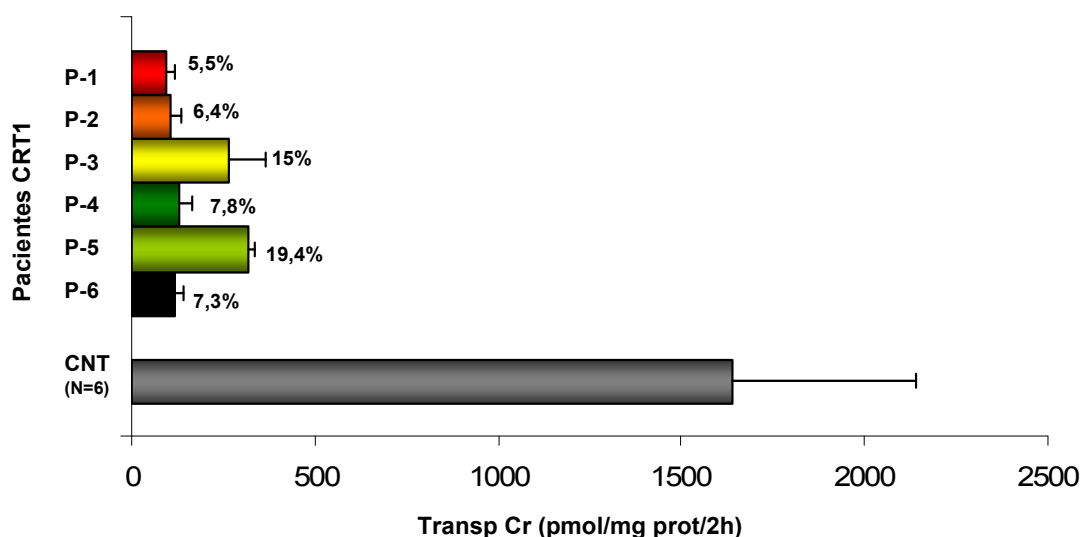


**Fig.15: Efecto del GPA 500 $\mu\text{M}$  sobre el transporte de Cr en fibroblastos control.** Transporte total (negro), transporte al incubar las células en presencia de GPA 500  $\mu\text{M}$  (rojo).



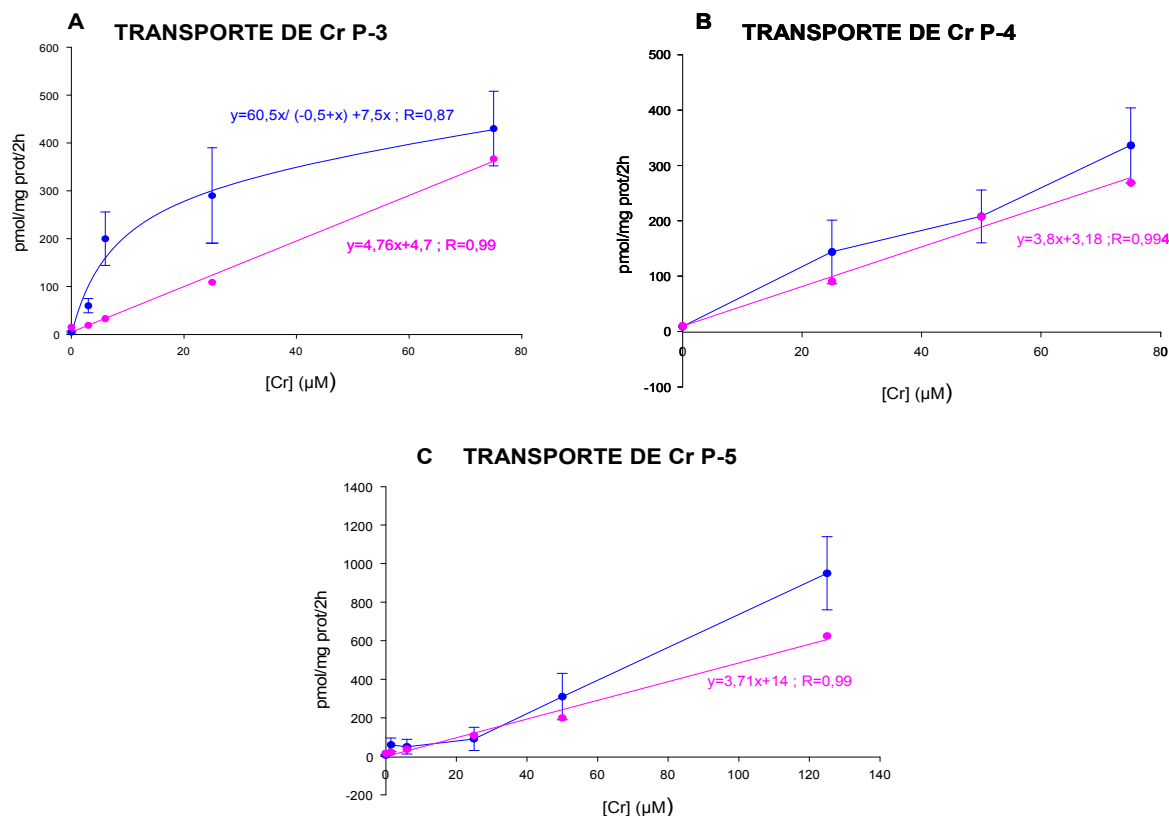
#### 4.2.2 Medida del transporte de creatina en fibroblastos de pacientes con sospecha de defecto en el transportador

Tras completar la caracterización del transporte en fibroblastos de individuos sanos, se estudió el transporte de Cr en fibroblastos de **12** de los **17** pacientes con aumento persistente de la relación urinaria Cr/Crn (Tabla A Anexo) y se seleccionaron los pacientes con el transporte de Cr disminuido. La medida se realizó en células previamente deplecionadas de Cr intracelular mediante incubación durante 24 horas en MEM con suero 10% dializado. Posteriormente se incubaron en presencia de Cr a la concentración fisiológica de 25 $\mu$ M, estudiando la concentración intracelular de la misma tras dos horas de incubación. Tal como muestra la Figura 16, todos los pacientes P-1 a P-6 presentaron reducciones drásticas en el transporte de Cr, con actividades residuales inferiores al 20% de la medida obtenida en controles.



**Fig.16: Transporte total de Cr a 25 $\mu$ M en fibroblastos de los pacientes y en líneas control (n=8).** En el eje **x** se representa el transporte de Cr (pmol/mg prot/2h) y en el eje **y** los pacientes de deficiencia del transportador CRT1. Los resultados son la media  $\pm$  DE de al menos 7 ensayos independientes (realizados por triplicado). CNT: Línea control. Los porcentajes de transporte específico de Cr de los pacientes a 25 $\mu$ M están referidos a la media del transporte de los individuos control.

En los casos en los que fue posible, se realizaron ensayos de medida de transporte a velocidades iniciales y concentraciones crecientes de Cr para la determinación de Km y Vmax. Como en experimentos anteriores la difusión se determinó inhibiendo el transporte total con Cr 5mM.



**Fig.17: Estudio del transporte total y difusión en fibroblastos en los pacientes P-3 (A), P-4 (B) y P-5 (C).** Transporte total (azul), Transporte inespecífico o difusión (rosa). Los datos corresponden a las medias de 4 experimentos independientes. En el paciente P-3 el perfil cinético se ajusta con un coeficiente  $R = 0,87$  a una hipérbola cuadrática de tres parámetros, para los P-4 y P-5 el perfil se ajusta a una recta.

La Figura 17 refleja las cinéticas del transporte de Cr medidas para los pacientes P3, P-4 y P-5. En el caso del transporte en los fibroblastos de P-3 se determinó una  $K_m = 11 \pm 6$  μM, similar a la de fibroblastos control y una  $V_{max}$  cuatro veces menor ( $475 \pm 59$  pmol/mg/2h). En el caso de P-4 la gráfica de transporte total es similar a la determinada para la difusión. Para P-5 el perfil observado coincide con el de la difusión a bajas concentraciones de Cr pero sufre un incremento del transporte a concentraciones de Cr superiores a 60 μM.

### 4.3 ACTIVIDAD GAMT

La actividad GAMT se determinó en el Instituto de Bioquímica Clínica de Barcelona, en fibroblastos de tres de los cuatro pacientes que en un principio se preseleccionaron con sospecha de deficiencia de GAMT (Tabla B Anexo). Los tres pacientes estudiados, P-7, P-8 y P-9 mostraron una actividad residual menor de un 4 % respecto a la media de controles (Tabla 2). Para el cuarto caso con sospecha de deficiencia en GAMT no fue posible determinar dicha actividad por no disponer de fibroblastos del mismo.

## 4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS POSIBLES PACIENTES

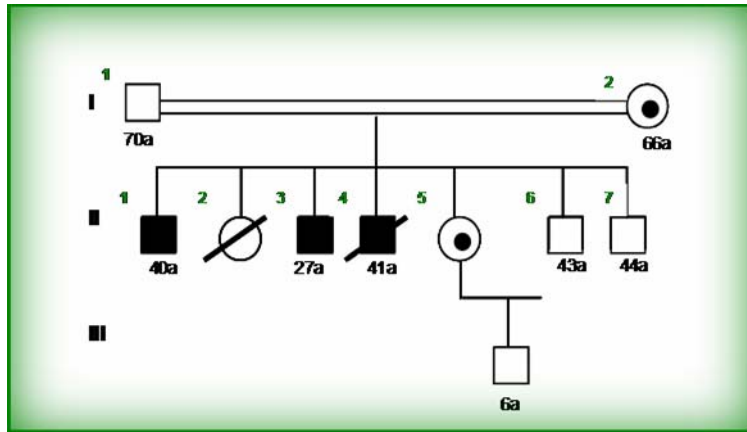
Con el fin de identificar las variantes nucleotídicas susceptibles de ser causantes de enfermedad, en los 26 pacientes preseleccionados se realizó un análisis molecular del gen correspondiente: **17** pacientes con sospecha de defecto en el transporte de Cr (gen SLC6A8), **4** con sospecha de deficiencia de GAMT y **4** pacientes con sospecha de deficiencia de AGAT. El análisis genético incluyó, siempre que fue posible, la amplificación de toda la región codificante de los genes correspondientes y la caracterización de los cambios identificados mediante análisis de DNA genómico. En todos los casos se descartó la presencia de la variación identificada en las bases de datos de SNP's (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>). En los pacientes en los que se encontraron variantes nucleotídicas, el estudio se completó siempre que fue posible analizando el perfil de segregación alélica en la familia. Para todas las variaciones nucleotídicas no reportadas previamente y con efecto previsible de cambio de aminoácido, se completó el estudio descartando la aparición del cambio en 300 alelos control. Con el mismo objetivo anterior, la consideración de si una mutación había sido reportada previamente se hizo tras confirmar su presencia en la base de datos Biobase (HGMD Professional 2010.1).

### 4.4.1 Estudio genético de pacientes con sospecha de deficiencia en el transporte de creatina (gen SLC6A8)

En los **6** pacientes con defecto confirmado de deficiencia en el transporte de Cr, se identificaron 6 variaciones nucleotídicas, susceptibles de ser patogénicas, que aparecían con el patrón de hemicigosidad característico de la herencia ligada al cromosoma X. La distribución de los cambios incluyó tres cambios puntuales no descritos previamente y con efectos predecibles de mutación sin sentido o de cambio de aminoácido **c.462G>A** (p.W154X), **c.1210G>C** (p.A440P) y **c.1396G>A** (p.G466R) y tres deleciones en fase, **c.1079\_1081delTCT** no reportado previamente y **c.1006\_1008delAAC** y **c.1222\_1224delTTC** ya descritas en otras poblaciones (Tabla 6). Estas variaciones se encontraban distribuidas en los distintos exones del gen SLC6A8. En los **11** casos restantes no se identificaron cambios patogénicos descartándose con ello un defecto a este nivel. Los pacientes en los que no se encontraron variantes nucleotídicas en el gen SLC6A8 se corresponden con aquellos que presentaban un transporte de Cr similar a los controles.

La segregación de la variación alélica encontrada en los pacientes sólo pudo ser confirmada en la familia del paciente P-3. En las otras 4 familias estudiadas, las madres

portadoras obligadas no presentaban las variaciones identificadas en los casos índice. A continuación se muestra el árbol genealógico de la familia del paciente P-3 y la segregación alélica mendeliana de la mutación **c.1079\_1081delTCT**. El paciente P-3 (II-1) posee padres consanguíneos, siendo la madre portadora de la variación (I-2), tiene un hermano vivo afectado de la misma deficiencia (II-3) y otro, fallecido al que no se le pudo realizar el estudio y que por la información de que disponemos probablemente estuviera también afecto (II-4). La hermana (II-5) es portadora de la misma variación nucleotídica (Fig.18).



**Fig.18: Árbol genealógico del paciente P-3 (individuo II-1).** La herencia ligada al cromosoma X se confirma en este pedigrí. Los números romanos indican la generación y los números griegos el individuo. El cuadrado vacío indica varón sano, el cuadrado con fondo negro indica varón afecto. El círculo vacío indica mujer sana, el círculo con un punto negro indica mujer portadora de la mutación. Una línea diagonal que atraviesa una figura indica que ese individuo ha fallecido. Debajo de cada individuo se muestra la edad en el momento de realización del estudio.

#### 4.4.2 Estudio genético de pacientes con sospecha de deficiencia de GAMT

En este estudio se incluyeron los **4** pacientes con sospecha de deficiencia de GAMT, y se identificaron **5** variaciones nucleotídicas, **3** de ellas no descritas previamente. La distribución de los cambios incluyó la delección **c.145delT** con efecto previsible de cambio en la pauta de lectura (p.Y49fs), identificada en homocigosis en el paciente P-8, y cuatro cambios puntuales, dos con efecto previsible de parada prematura **c.316C>T** (p.Q106X)] y **c.521G>A** (p.W147X); y dos de cambio de aminoácido; **c.59G>C** (p.W20S) y **c.407C>T** (p.T136M), todos ellos identificados en heterocigosis en los pacientes P-7 y P-9 según se describe en la Tabla 7. Los pacientes en los que se encontraron variantes nucleotídicas en el gen GAMT se corresponden con aquellos a los que se les detectó una actividad enzimática GAMT disminuida. En los estudios de portadores y segregación alélica de las variaciones encontradas en el gen GAMT se pudo confirmar la herencia mendeliana en la familia del P-7, y en la madre del P-9, en los otros casos las muestras no estaban disponibles.

#### 4.4.3 Estudio genético en pacientes con sospecha de deficiencia de AGAT

El estudio de mutaciones en el gen AGAT se realizó en 4 individuos seleccionados por el perfil bioquímico de excreción de GAA. En ninguno de ellos se identificaron variantes que pudieran considerarse mutaciones patogénicas. Sólo se encontraron algunas variantes ya descritas como SNP's en la base de datos pública en los individuos 12, 13 y 16 (Tabla 5 y Tabla C Anexo).

**Tabla 5: Resumen de los SNP's en el gen AGAT**

CASO	VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS	EFFECTO EN LA PROTEÍNA
12	c.330A>T c.1252T>C c.70-38G>T c.70-77C>T	rs1288775 rs1145086 rs12437840 rs12437887
13	c.330A>T c.1252T>C c.70-38G>T c.70-77C>T	rs1288775 rs1145086 rs12437840 rs12437887
16	c.1252T>C	rs1145086

#### 4.5 ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIACIONES NUCLEOTÍDICAS IDENTIFICADAS

Una vez conocidos los cambios nucleotídicos que portan nuestros pacientes fue necesario profundizar en su análisis para intentar comprender el mecanismo molecular responsable de su patogénesis. El análisis funcional de las variantes nucleotídicas nuevas se abordó a diferentes niveles:

**1)** Estudios *in silico* predictivos de posible patogenicidad **2)** Análisis de los transcritos SLC6A8 y GAMT. Estudios de estabilidad de mRNA y caracterización de mutaciones susceptibles de provocar activación de NMD **3)** Detección del transportador de Cr (CRT1) en fibroblastos de pacientes por Western Blot.

#### **4.5.1 Estudio *in silico* de la posible patogenicidad de las variaciones nucleotídicas**

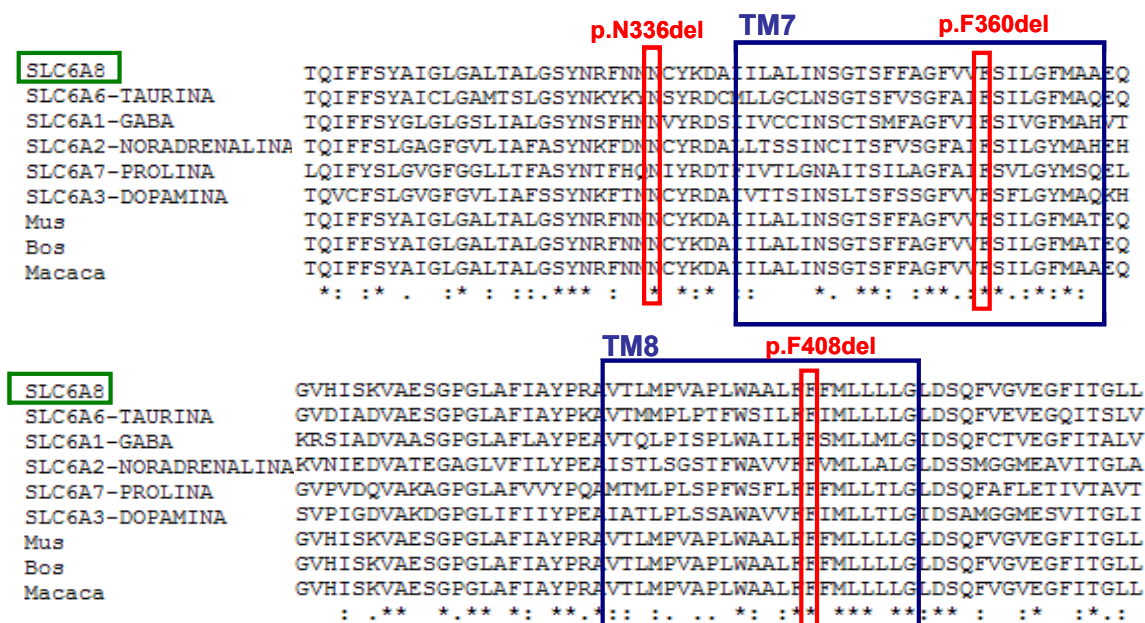
Para los cambios **p.W154X** (gen SLC6A8) y **p.Y49fs**, **p.Q106X** y **p.W174X** (gen GAMT) se puede asumir su carácter de cambios causantes de enfermedad ya que provocan una parada prematura de la traducción (PTC) o un cambio de pauta de lectura que finalmente causa un PTC. Sin embargo, el resto son variaciones de secuencia para las que la patogenicidad es más difícil de predecir. En estos casos las herramientas bioinformáticas se convierten en un elemento muy útil que nos aproxima al efecto funcional del cambio.

- **Variaciones que provocan un cambio de aminoácido**

La predicción sobre el posible impacto de la sustitución aminoacídica en la estructura proteica se ha analizado utilizando la herramienta informática ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) (Larkin, et al., 2007) y para conocer la conservación de la región y más concretamente del aminoácido con el programa informático PolyPhen (*Polymorphism Phenotyping*) (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/Polyphen/>) (Ramensky, et al., 2002) que predice el posible impacto de sustituciones aminoacídicas en la estructura y función de una proteína humana teniendo en cuenta consideraciones físicas y comparativas como son la conservación del dominio y del aminoácido, plegamiento y estructura cristalina de la proteína. Los resultados de este programa se expresan como variación “benigna”, “posiblemente patogénica”, “probablemente patogénica” y “desconocido”. En las Tablas 6 y 7 se resumen las predicciones de patogenicidad de las mutaciones de cambio de aminoácido identificadas en nuestra serie de pacientes y los resultados del estudio de conservación. Como se puede apreciar, las cuatro variantes son predichas como potencialmente patogénicas siendo la variación **c.1210G>C (p.A404P)** la que se considera de menor gravedad.

- **Variaciones que provocan una pequeña delección en fase**

Para estas variaciones nos hemos basado en alineamientos y comparaciones de secuencia utilizando la herramienta ClustalW para conocer la conservación de la región y del aminoácido. De acuerdo con esta aproximación todas las variaciones en el gen SLC6A8 afectan a residuos localizados en dominios transmembrana que son regiones altamente conservadas en otros transportadores parálogos dependientes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (Fig.19). Los resultados se resumen también en la Tabla 6.



**Fig.19: Estudios *in silico* basados en comparación por homología (ClustalW2).** Alineamiento múltiple de la proteína SLC6A8 humana con diferentes proteínas parálogas (Familia de transportadores dependientes de Na<sup>+</sup>) y proteínas ortólogas. (\*) residuos idénticos, (:) sustituciones conservadas, (.) sustituciones semiconservadas. Las especies comparadas son de arriba abajo: Mus musculus, Bos taurus y Macaca mulata y SLC6A1 corresponde al transportador de GABA T1. Se señalan en rojo la posición de las variaciones nucleotídicas en azul los dominios transmembrana.

Tabla 6: Mutaciones en el gen SLC6A8, localización de las mismas y predicción de patogenicidad

EX	PAC	VARIACIÓN	EFFECTO PROTEINA	DOMINIO	CONSERVACIÓN	PREDICCIÓN POLYPHEN	EFFECTO PREDICCIÓN POLYPHEN
3	P-1	<b>c.462G&gt;A</b>	<b>p.W154X</b>	-----	----	----	
6	P-2	c.1006_1008delAAC	p.N336del	Citoplásmico	Aminoácido altamente conservado en una región conservada en la familia de transportadores y en proteínas ortólogas (Fig.19)	----	
7	P-3	<b>c.1079_1081delTCT</b>	<b>p.F360del</b>	TM7	Aminoácido altamente conservado en una región conservada en la familia de transportadores y en proteínas ortólogas (Fig.19)	----	
8	P-4	<b>c.1210G&gt;C</b>	<b>p.A404P</b>	TM8	Región conservada en la familia de transportadores y proteínas ortólogas	<b>Posiblemente patogénica</b>	Sustitución incorrecta en región transmembrana
8	P-5	c.1222_1224delTTC	p.F408del	TM8	Región y aminoácido altamente conservados en la familia de transportadores y en proteínas ortólogas (Fig.19)	----	
10	P-6	<b>c.1396G&gt;A</b>	<b>p.G466R</b>	TM9	Aminoácido altamente conservado en una región conservada en la familia de transportadores y en proteínas ortólogas (Fig.19)	<b>Probablemente patogénica</b>	

EX: Exón, PAC: Paciente. TM: Transmembrana. Se muestran en **negrita** las mutaciones nuevas descritas en este trabajo. La predicción de patogenicidad en color **rojo** indica mayor grado de severidad y el color **naranja** menor.



Tabla 7: Mutaciones en el gen GAMT, localización de las mismas y predicción de patogenicidad

EX	PAC	VARIACIÓN	EFEECTO PROTEINA	DOMINIO	CONSERVACION	PREDICCIÓN POLYPHEN	EFEECTO PREDICCIÓN POLYPHEN
1	P-7	c.59G>C	p.W20S	N-Terminal	Aminoácido altamente conservado en proteínas ortólogas	Probablemente patogénica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ruptura de un sitio funcional cercano a la zona de unión a ligando.</li> <li>• Creación de una cavidad en sitio interno</li> </ul>
1	P-8	<b>c.145delT</b>	<b>p.Y49fs</b>	----	----	----	
2	P-9	<b>c.316C&gt;T</b>	<b>p.Q106X</b>	----	----	----	
4	P-9	<b>c.407C&gt;T</b>	<b>p.T136M</b>	Núcleo	Región altamente conservada en proteínas ortólogas	Probablemente patogénica	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cercana a zona de unión a ligando</li> <li>• Cercano a sitio funcional</li> <li>• Cercano a otras cadenas</li> <li>• Cambio de hidrofobicidad en un sitio interno</li> </ul>
5	P-7	c.521G>A	p.W174X	----	----	----	

EX: Exón, PAC: Paciente. TM: Transmembrana. Se muestran en **negrita** las mutaciones nuevas descritas en este trabajo. La predicción de patogenicidad en color **rojo** indica el mayor grado de severidad.

- **Búsqueda *in silico* de mutaciones que afecten al procesamiento del mRNA**

Se ha descrito que el 15% de las mutaciones puntuales consideradas patogénicas provocan enfermedades porque alteran el correcto procesamiento del mRNA. Por tanto, actualmente se considera importante evaluar si los cambios de secuencia identificados en un gen pueden además de por ejemplo, cambiar un aminoácido por otro, provocar alteraciones en el procesamiento del mRNA cuya consecuencia podría ser la aparición de una proteína truncada o la pérdida del gen correcto. Para ello se han desarrollado y mejorado plataformas bioinformáticas que facilitan este estudio. En nuestro caso, la predicción bioinformática se ha realizado utilizando la plataforma disponible en la web “Human Splicing Finder” (HSF) que a su vez compendia las predicciones de varios programas y todas las matrices disponibles para la predicción de motivos exónicos e intrónicos. Este análisis nos permite conocer si las variaciones nucleotídicas podrían afectar o no a secuencias consenso implicadas en el procesamiento del mRNA. Para ello, el programa predice valores o *scores* que indican la susceptibilidad de ser reconocida una secuencia por la proteína que se une a ella, a mayor *score* mayor susceptibilidad de unión.

La Tabla 20 muestra todas las variantes de SLC6A8 y GAMT para las que el programa predice cambios en los *scores* de secuencias de unión de factores de *splicing*, alteraciones que podrían favorecer la no selección de la secuencia de reconocimiento correcta.

**Tabla 20: Resultados de la predicción con HSFinder de la posible alteración de secuencias reguladoras de *splicing*.**

GAMT		
EX 7	c.1078-1080delTTC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SC35</b> (76,03&gt;85,13)</li> <li>• <b>Ruptura SRp40</b></li> <li>• <b>SRp55</b> (77,45&gt;77,45)</li> </ul>
EX 8	c.1210G>C	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SC35</b> (75,29&gt;83,53)</li> <li>• <b>SF2/ASF</b> (73,92&gt;76,85)</li> </ul>
EX 10	c.1396C>G	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SF2/ASF</b> (72,03&gt;86,43)</li> </ul>
SLC6A8		
EX 1	c.145delT	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Alteración del <i>Branch point</i></b> (54,72&gt;84,98)</li> <li>• <b>SC35</b> (79,96&gt;91,09)</li> <li>• <b>SF2/ASF</b> (77,46&gt;73,92)</li> </ul>
EX 4	c.407C>T	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SRp40</b> (91,08&gt;80,84 )</li> <li>• <b>SRp55</b> (88,76&gt;74,08)</li> <li>• <b>SF2/ASF</b> (84,49&gt;74,56)</li> </ul>

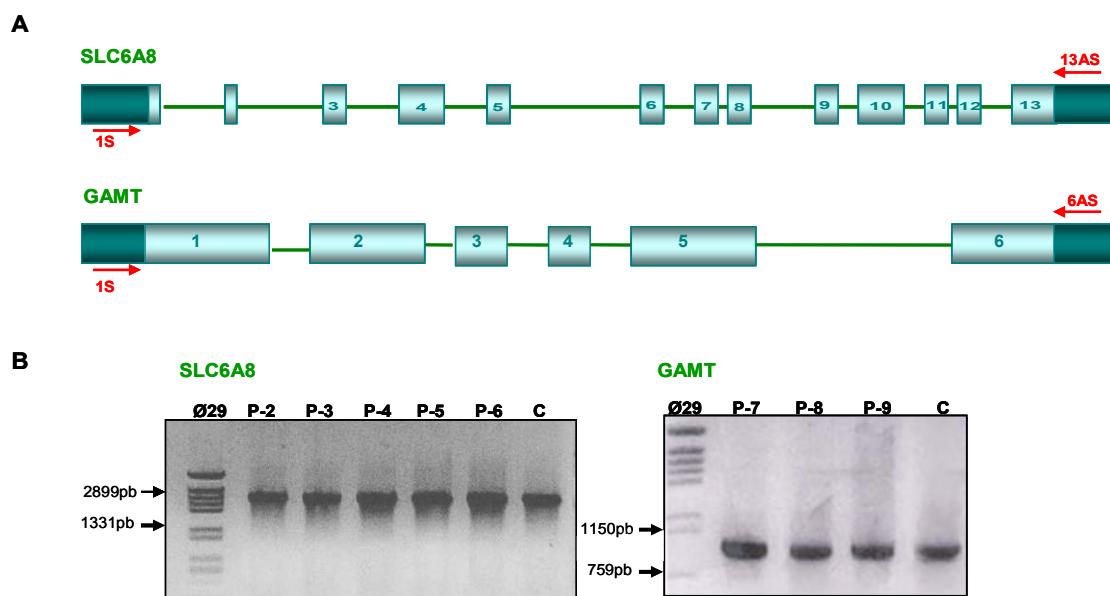
Entre paréntesis se muestra el cambio que sufre el *score* de la secuencia normal a la secuencia alterada por la variación.

### 4.5.2 Análisis de transcritos de SLC6A8 y GAMT

El estudio se ha abordado a dos niveles: 1) Estudio *in vitro* mediante RT-PCR a tiempo final 2) Cuantificación *in vitro* de la abundancia relativa de transcritos mediante qRT-PCR.

- Estudio *in vitro* mediante RT-PCR a tiempo final

Para evaluar la existencia de un procesamiento aberrante del mRNA en los pacientes, se realizó la amplificación mediante RT-PCR del cDNA completo de los genes SLC6A8 y GAMT, generando para ello amplicones de 2025pb y 1010pb respectivamente. Se comprobó en todos los casos que los productos amplificados se correspondían con los tamaños esperados (Fig.20). La secuenciación directa de los fragmentos amplificados no permitió identificar transcritos aberrantes en ninguna de las líneas celulares (datos no mostrados).



**Fig.20: Análisis RT-PCR A)** Representación esquemática de los genes SLC6A8 y GAMT. Las flechas rojas indican la posición de los *primers* utilizados para amplificar la región codificante de ambos genes. **B)** cDNA amplificado mediante RT-PCR de fibroblastos control (C) y de pacientes SLC6A8 (P-2-P-6) y GAMT (P-7-P-9). El tamaño del fragmento amplificado de SLC6A8 es de 2025pb (1S-13AS) y de GAMT 1010 pb (1S-6AS).

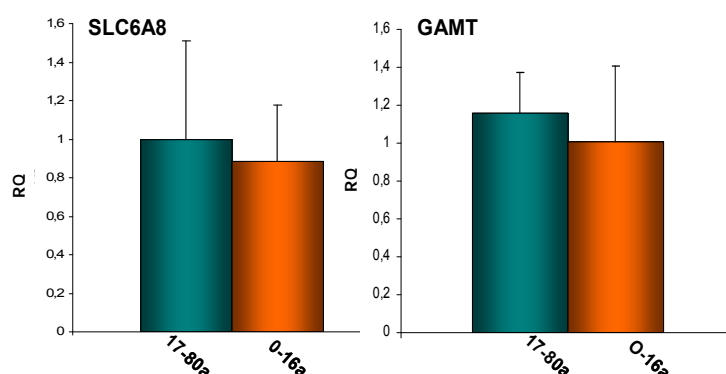
- Cuantificación *in vitro* de mRNA mediante qRT-PCR

La ausencia de transcritos aberrantes en condiciones de RT-PCR a tiempo final no permite descartar la existencia de algún producto de *splicing* que pudiese resultar

degradado. Por ello se consideró importante realizar una determinación cuantitativa de transcritos mediante qRT-PCR y el posterior rescate eventual de transcritos aberrantes si los hubiera.

### ✓ Variaciones en la expresión relativa de transcritos con la edad

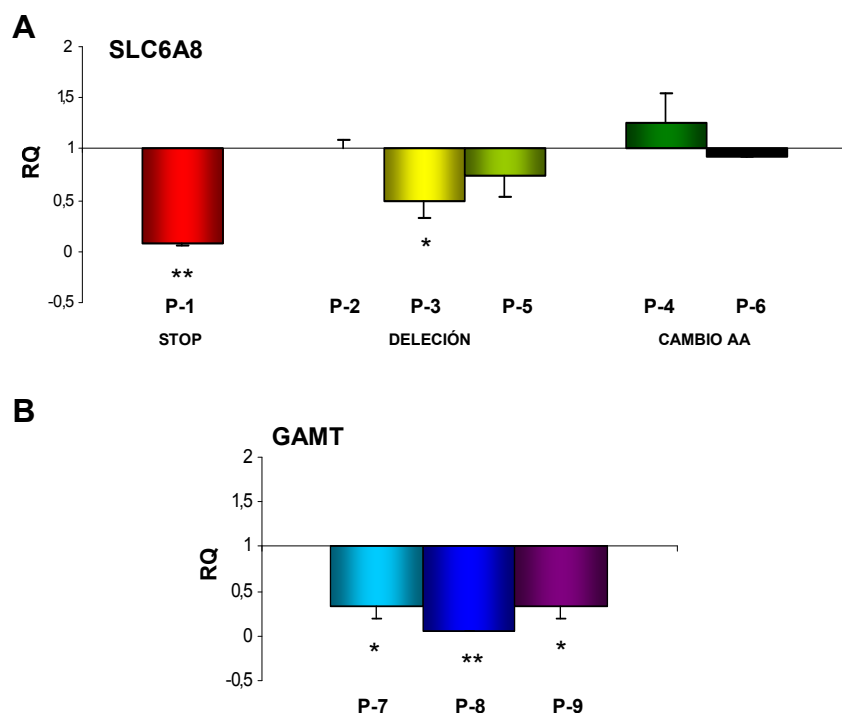
Los cultivos primarios utilizados en el estudio proceden de pacientes con edades que oscilan entre los 2-40 años. Se desconocía si existen variaciones en el perfil de expresión de los distintos genes implicados en el metabolismo de la Cr con la edad. Por ello, previo al estudio en pacientes se realizó el análisis y cuantificación de mRNA en fibroblastos control. Se establecieron dos grupos de edad, uno incluía fibroblastos procedentes de individuos entre 0-16 años y otro de 17-80 años. La cuantificación nos indicó que no existen diferencias significativas en el patrón de expresión de los genes SLC6A8 y GAMT con la edad (Fig.21). Por consiguiente para el resto de los estudios de cuantificación de transcritos, el bloque correspondiente a las líneas control agrupa a todas ellas sin separación por edades.



**Fig.21: Cuantificación de mRNA de SLC6A8 y GAMT en fibroblastos control.** En el eje x se representan las líneas celulares ordenadas por grupo de edad (0-16 años) y (17-80 años) y en el eje y se representa el RQ de cada línea, siendo  $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ .  $\Delta\Delta Ct$  calculado como la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de la muestra y el  $\Delta Ct$  del control interno.  $\Delta Ct$  es la variación existente dentro de la misma línea. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  DE de al menos tres experimentos independientes.

### ✓ Abundancia relativa de transcritos en fibroblastos de pacientes

Se ha cuantificado la abundancia relativa de SLC6A8 y GAMT en los fibroblastos de los pacientes CRT1 y GAMT respectivamente mediante qRT-PCR. Los resultados de la Figura 22 muestran la razón normalizada de la expresión del mRNA de SLC6A8 y GAMT respectivamente respecto al mRNA de GAPDH utilizado como control.



**Fig.22: Abundancia relativa de transcritos de SLC6A8 y GAMT mediante qRT-PCR.** A) Cuantificación del mRNA de SLC6A8 en líneas de pacientes CRT1. B) Cuantificación del mRNA de GAMT en líneas de pacientes GAMT. En el eje x se representan las líneas celulares de los pacientes ordenadas según el tipo de mutación y en el eje y se representa el RQ de cada línea. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  DE de al menos tres experimentos independientes. El valor de RQ =1 corresponde al valor obtenido del promedio de 7 líneas control. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Todas las células de pacientes tanto CRT1 como GAMT con alelos PTCs presentaban niveles de expresión de los genes SLC6A8 o GAMT significativamente disminuidos con respecto a los de líneas celulares de individuos control. En el caso de pacientes hemicigotos como el P-1 **c.462G>A, (p.W154X)** de CRT1 o homocigotos como el paciente P-8 **p.[Y49fs]+[Y49fs]** de GAMT, donde la mutación tras producir cambio de pauta de lectura genera un PTC, la asunción es directa. Para los pacientes GAMT P-7 **[c.59C>G]+[c.521G>A]** o p. **[W20S]+[W174X]** y P-9 **p.[Q106X]+[T136M]**, en los que los alelos PTC son portados en heterocigosis con mutaciones de cambio de aminoácido, la interpretación del efecto de los cambios sobre la abundancia relativa de transcritos es más difícil. Es especialmente interesante resaltar la reducción estadísticamente significativa (50%) identificada en el caso del paciente CRT1 P-3 dada la naturaleza de la variación **c.1079\_1081delTCT, (p.F360del)**.

Tabla 21: Resultados de transporte de Cr o actividad GAMT y nivel de expresión del gen afectado en cada caso

Paciente	Defecto	Transporte Cr / Activ GAMT %	Genotipo/ Efecto proteína	Cuantificación relativa de tránscrios RQ	
				SLC6A8	GAMT
P-1	CRT1	5,5	c.462G>A p.W154X	0,07±0,02**	-----
P-2	CRT1	6,4	c.1006_1008AAC p.N336del	1,0± 0,1	-----
P-3	CRT1	15	c.1079_1081delTCT p.F360del	0,5± 0,16*	-----
P-4	CRT1	7,8	c.1210G>C p.A404P	1,2± 0,30	-----
P-5	CRT1	19	c.1222_1224delTTC p.F408del	1,7± 0,20	-----
P-6	CRT1	7,3	c.1396G>A p.G466R	0,9± 0	-----
P-7	GAMT	2,8	c. [59C>G] + [521G>A] p. [W20S] + [.W174X]	-----	0,3± 0,12*
P-8	GAMT	3,7	c.[145delT] + [145delT] p.[Y49fs] + [Y49fs]	-----	0,06± 0,006**
P-9	GAMT	4,1	c. [316C>T] + [407C>T] p. [Q106X] + [T136M]	-----	0,3± 0,1*
CNT		100		1	1

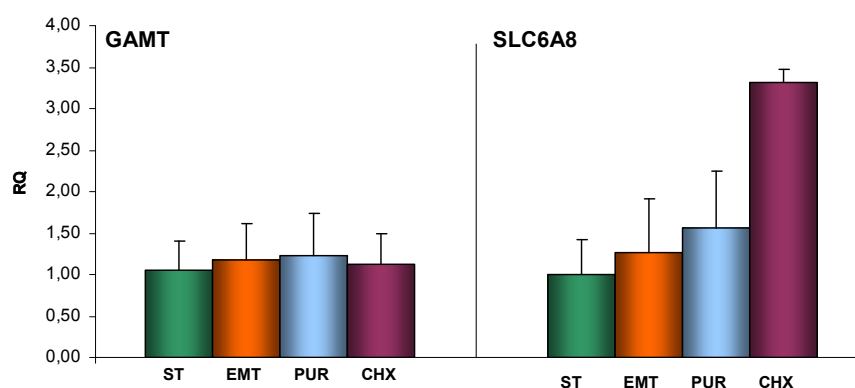
Cnt: Control. Referencia de las secuencias en GeneBank: NM\_005629.3 para SLC6A8 y NM\_000156.4 para GAMT. % Transporte de Cr con respecto a los valores determinados en fibroblastos control. Los datos de la cuantificación de tránscrios corresponden a la media del  $RQ \pm DE$  de al menos tres ensayos independientes, siendo  $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ .  $\Delta\Delta Ct$  calculado como la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de la muestra y el  $\Delta Ct$  del control interno.  $\Delta Ct$  es la variación existente dentro de la misma línea. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$

### 4.5.3 Caracterización de mutaciones susceptibles de provocar activación de NMD

El NMD depende de una serie de factores altamente conservados que modulan tanto la estabilidad del transcrito correspondiente como la terminación de la traducción. Se han descrito diversos agentes que por diferentes mecanismos pueden intervenir bloqueando la traducción y permitiendo por tanto el rescate de transcritos aberrantes que de otro modo serían degradados (Linde, et al., 2007). Por tanto, para caracterizar si las distintas variaciones identificadas eran susceptibles de provocar activación de NMD, se cuantificaron los niveles de mRNA de los fibroblastos de los pacientes tratados con agentes que inhiben el NMD.

- **Elección de agentes de parada de traducción**

Para seleccionar el inhibidor de la traducción más adecuado para este estudio se eligieron tres agentes comúnmente utilizados con este propósito y se incubaron fibroblastos control a concentraciones y periodos de incubación previamente descritos en la literatura. La incubación se realizó con puromicina (Brichta, et al., 2008) que causa una parada prematura de la traducción, con emetina (Brichta, et al., 2008) que ejerce su acción por unión a la subunidad 40S del ribosoma (Jimenez, et al., 1977), o con cicloheximida (Macias-Vidal, et al., 2009) que interfiere el proceso de translocación. Los resultados del efecto producido por los distintos agentes de parada de la traducción se muestran en la Figura 23.



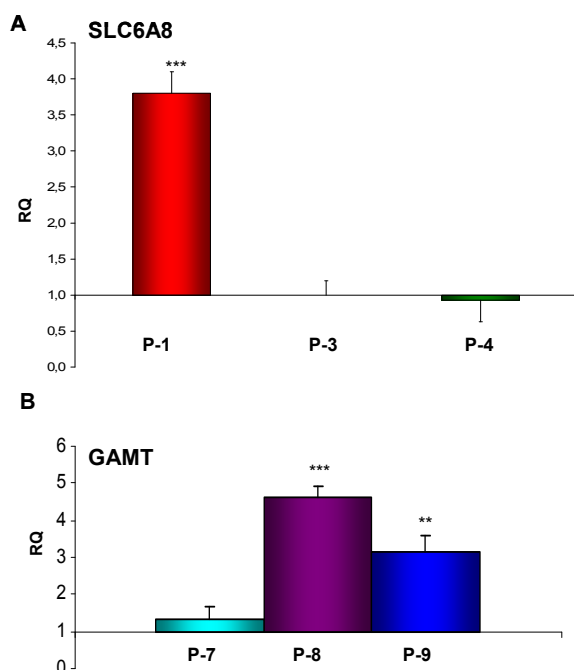
**Fig.23: Abundancia relativa de transcritos de GAMT y SLC6A8 cuantificados mediante qRT-PCR en fibroblastos control tratados con diferentes agentes de parada de traducción.** En el eje x se representan los distintos tratamientos utilizados y en el eje y se representa el RQ de cada línea celular, siendo  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ .  $\Delta\Delta Ct$  se calcula como la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de la muestra y el  $\Delta Ct$  del control interno.  $\Delta Ct$  la variación existente dentro de la misma línea. ST: Sin tratamiento, EMT: Emetina, PUR: Puromicina, CHX: Cicloheximida. Los datos representados corresponden a la media  $\pm$  DE de dos experimentos independientes con réplicas.

De los resultados se desprende que la emetina y puromicina no modificaban significativamente la expresión de los genes GAMT y SLC6A8. Del mismo modo se

realizaron cuantificaciones de mRNA en los fibroblastos de varios pacientes con los tres tratamientos. Finalmente se eligió la emetina para continuar el estudio puesto que no alteraba los niveles de mRNA en los fibroblastos control y causaba las variaciones más significativas en los fibroblastos de pacientes (datos no mostrados).

- **Cuantificación de mRNA en fibroblastos tratados con emetina**

En este estudio se incluyeron además de las líneas de fibroblastos de pacientes SLC6A8 y GAMT con disminuciones significativas en la abundancia relativa de los transcritos correspondientes, células de individuos control, y la línea del paciente P-4 **c.1210G>C, (p.A404P)**. Se midieron los niveles de mRNA del gen afectado en cada caso.



**Fig.24: Cuantificación de mRNA en fibroblastos tratados con emetina 100µg/ml durante 14 horas. A)** Cuantificación del mRNA de SLC6A8 en líneas de pacientes CRT1. **B)** Cuantificación del mRNA de GAMT en líneas de pacientes GAMT. En el eje x se representan las líneas celulares de pacientes y en el eje y el RQ de cada línea, siendo  $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$ .  $\Delta\Delta C_t$  es calculado como la diferencia entre el  $\Delta C_t$  de la muestra y el  $\Delta C_t$  del control interno. El valor de  $RQ =1$  corresponde a la media de controles con el mismo tratamiento.  $\Delta C_t$  es la variación existente en la línea. Los datos corresponden a la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes con duplicados. \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$

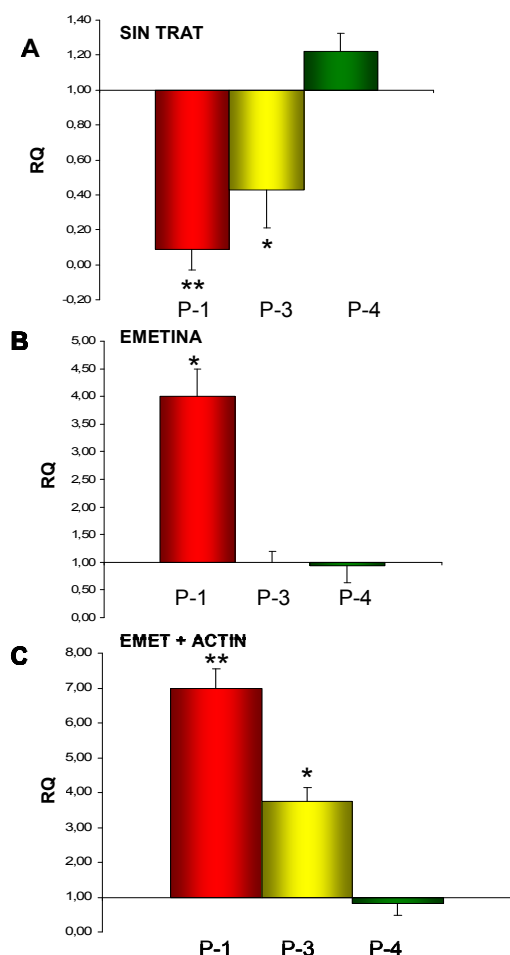
Tal como muestra la Figura 24, el tratamiento con emetina provocó un rescate aparente de transcritos y por tanto un aumento de los niveles de mRNA hasta valores control o superiores para todos los pacientes con alelos portadores de PTC, en el P-1 **p.W154X**; P-7 **p.[W20S]+[W174X]**, P-8 **c.[145delT]+[145delT]** y P-9 **p.[Q106X]+[T136M]** de SLC6A8 y GAMT respectivamente y además para el alelo de SLC6A8 del P-3 **c.1079\_1081delTCT**. Como era de esperar, no se observó aumento en la expresión en las líneas control ni en la línea del paciente P-4 **p.A404P**.

- **Estudio de estabilidad del mRNA de SLC6A8 en fibroblastos**

Una vez cuantificados los niveles de mRNA del gen SLC6A8 y observados aumentos significativos de expresión en dos de las líneas celulares de pacientes al ser tratadas con emetina y debido a su naturaleza hemicigótica, se procedió a estudiar si este rescate de transcritos era producto de un aumento en la estabilidad de los mismos o bien consecuencia



de un aumento en la síntesis de mRNA. Se trataron los fibroblastos conjuntamente con emetina y actinomicina D que es un inhibidor de la transcripción. Se estudiaron los fibroblastos de los P-1 y P-3 que eran los que mostraban los niveles más bajos de expresión de SLC6A8 y el P-4 por presentar niveles normales de expresión y tomarlo como referencia (Fig.25A).



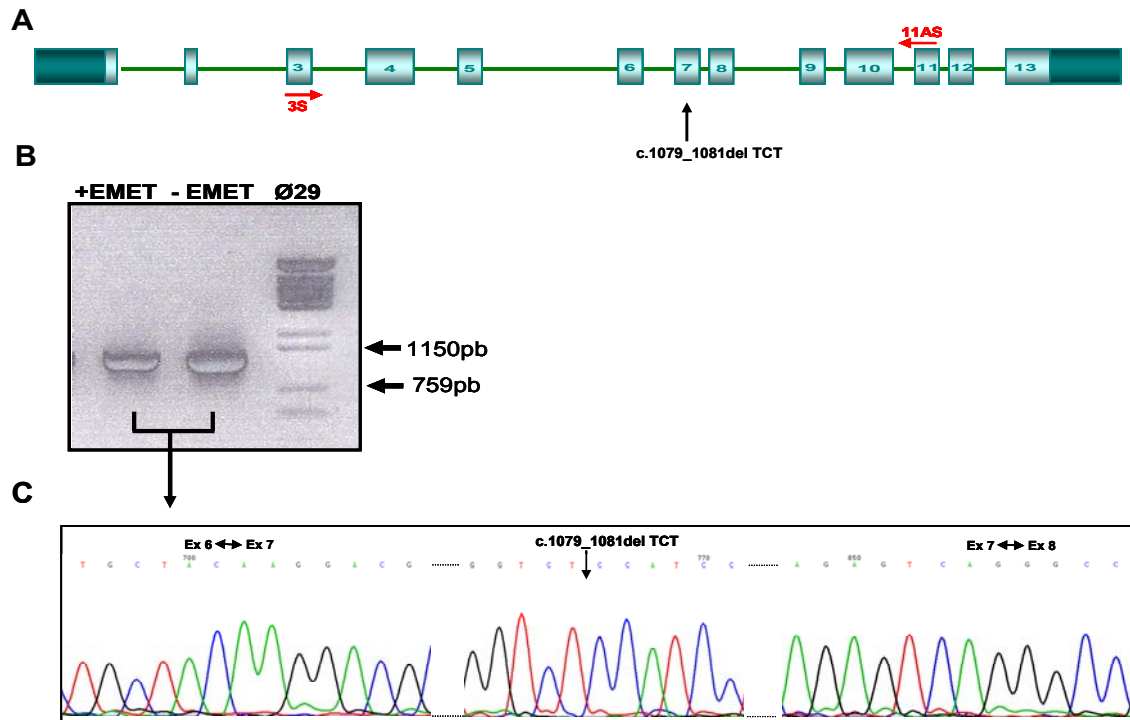
**Fig.25: Estudio de estabilidad del mRNA de SLC6A8.** Niveles de transcritos cuantificados con qRT-PCR. El valor de RQ =1 corresponde a la media de controles. **A)** Fibroblastos sin tratar **B)** Fibroblastos tratados con emetina 100µg/ml durante 14 horas **C)** Fibroblastos tratados con emetina 100µg/ml durante 14 horas y actinomicina D 10 µg/ml durante 1 hora. En el eje x se representan las líneas celulares de pacientes y en el eje y se representa el RQ de cada línea celular. Los datos representados corresponden a la media ± DE de dos experimentos independientes con triplicados. Sondas UPL. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

En P-1 y P-3 se observa un aumento en la expresión del mRNA al ser tratados con emetina mientras que no hay un rescate de transcritos en el P-4 (Fig.25B). Este rescate de transcritos en P-1 y P-3 persiste tras el tratamiento con emetina y actinomicina (Fig.25C). Estos resultados parecen indicar que este aumento en la cantidad relativa de transcritos se debe más a una estabilización de los mismos que a una activación transcripcional.

### • Caracterización de transcritos aberrantes

La forma más realista de establecer con certeza si los cambios identificados en el DNA afectan al procesamiento del mRNA es el análisis directo de los correspondientes transcritos procesados. En este estudio se incluyeron dos líneas de pacientes, el P-3 CRT1 **c.1079\_1081delTCT** con niveles de transcritos SLC6A8 reducidos en un 50% y cuya variación provoca una delección de un aminoácido (**p.F360del**) y que no parecía susceptible de sufrir NMD y el P-8 GAMT por ser homocigoto para el cambio **c.[145delT]+[145delT]**. Los fragmentos amplificados mediante RT-PCR en fibroblastos tratados y sin tratar tenían para el P-3 el tamaño esperado de 970 pb, correspondiente a un amplicón de SLC6A8 que incluye la región codificante entre los exónes 3 y 11 ambos inclusive. En el caso del gen

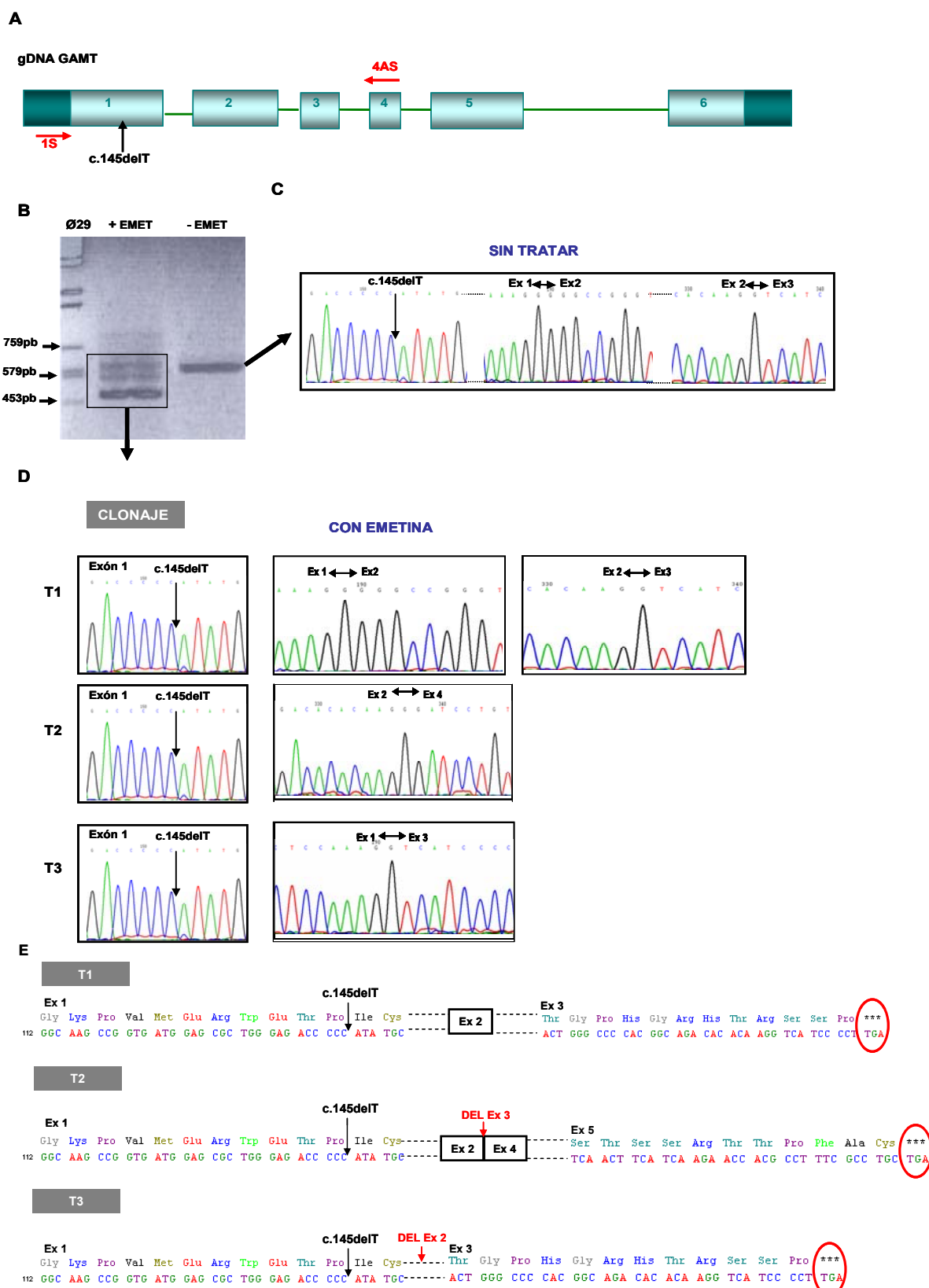
GAMT se generó un amplicón de 590 pb donde se incluía la región codificante comprendida entre los exones 1 y 4.



**Fig.26: RT-PCR de fibroblastos del P-3 tratados con emetina y sin tratar. A)** Representación esquemática del gen SLC6A8. **B)** Producto de la RT.PCR cargado en un gel de agarosa al 1%. El tamaño correcto del amplicón generado al amplificar con los *primers* 3S-11AS es 970pb. **C)** Clonaje y análisis por secuenciación

En P-3 el clonaje y secuenciación de la banda única amplificada por RT-PCR tras tratar las células con emetina permitió corroborar que el transcrito que aparece mayoritariamente representado se corresponde con aquel de tamaño normal, sin errores de procesamiento y que porta la variación **c.1079\_1081delTCT** (Fig.26). Además, se pudo identificar un transcrito aberrante presente en muy baja proporción (1/14 clones secuenciados) que incluye parte del intrón 4 y elimina los exones 5, 6, 7 y parte del 8, cuyo patrón aparente de *splicing* supondría la elección de sitios donadores y aceptores con secuencias muy alejadas al consenso para dichos sitios, por lo que asumimos que podría ser el reflejo de una modificación por la propia maquinaria bacteriana.

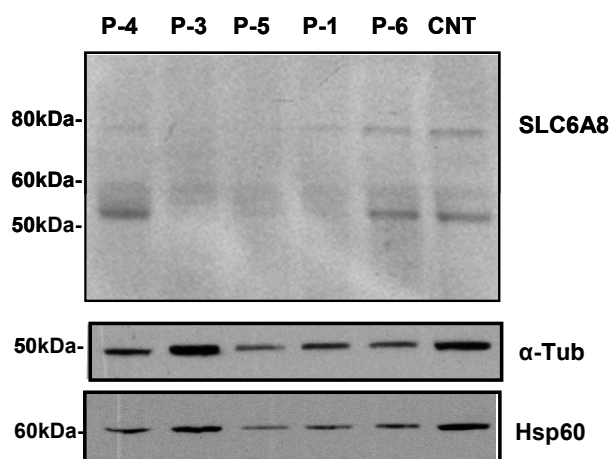
En el P-8 **c.[145delT]+ [145delT]** al clonar y secuenciar los tres productos de RT-PCR obtenidos en células tratadas con emetina (Figura 27B) se obtuvieron tres tipos de transcritos; uno de ellos, T1 de tamaño normal (590 pb) y con la delección de la T en el exón 1; y los transcritos T2 y T3 (< 590 pb) que además de portar la delección de la T eliminaban los exones 3 y 2 respectivamente (Fig.27D). En los tres casos, el producto final era un transcrito que contenía una parada prematura (Fig.27E), hecho que podría explicar su degradación por un mecanismo de NMD.



**Fig.27: Análisis del efecto de la variación c.145delT en los fibroblastos del paciente P-8.** **A)** Representación esquemática del gDNA del gen GAMT. *Flecha roja* indica la posición de los *primers* para la amplificación de la secuencia codificante de GAMT (RT-PCR). *Flecha negra* indica localización de la variación c.145delT. **B)** Resultado del estudio de la RT-PCR del cDNA de GAMT en fibroblastos del P-8 tratados con emetina y sin tratar. Los *primers* (1S y 4AS) en la RT-PCR generan un amplicón esperado de 590 pb que abarcaría desde el exón 1 hasta el 4. **C)** Secuencia visualizada con el programa CHROMAS de la RT-PCR de los fibroblastos sin tratar. **D)** Clonaje y análisis por secuenciación de los distintos mRNA's amplificados en la RT-PCR de los fibroblastos tratados con emetina. T1: Tránsito de tamaño normal con la variación c.145delT en el exón 1. T2: Tránsito de un tamaño menor al normal (526pb), con la variación c.145delT en el exón 1 y la delección del exón 3. T3: Tránsito de un tamaño menor a T1 y T2 (455pb), con la variación c.145delT en el exón 1 y la delección del exón 2. **E)** Posible traducción de los tránsitos aberrantes \*\*\* Indica la localización de un codón de terminación prematura de la transcripción.

#### 4.5.4 Caracterización de la proteína CRT1

Para evaluar el efecto de las mutaciones identificadas en el gen SLC6A8 sobre la cantidad de proteína, se realizó un *Western Blot* de la proteína CRT1 en los lisados de proteína total de fibroblastos de los pacientes CRT1. La detección de esta proteína está descrita como particularmente difícil debido a los distintos estados de glicosilación que presenta (Straumann, et al., 2006). Están descritas varias bandas de detección de esta proteína en *Western Blot* pero dos de ellas, las bandas de  $\cong 55$ -58 y 75-91 kDa se describen como principales, aunque se sabe que pueden existir variaciones en el tamaño molecular según el gel y las líneas celulares utilizadas. Se han llegado a observar bandas de tamaños superiores e inferiores en otros tejidos (Speer, et al., 2004). Como control de carga se utilizó la proteína  $\alpha$ -Tubulina. Puesto que se ha descrito para alguno de los anticuerpos comerciales anti CRT1 una reactividad cruzada con el componente E2 de la deshidrogenasa mitocondrial (Speer, et al., 2004), se ha introducido también la detección de Hsp60 como control de carga mitocondrial.



**Fig.28: Western blot de CRT1.** El estudio incluye fibroblastos de pacientes CRT1 y una línea control. Se ha utilizado como control de carga de proteína la proteína  $\alpha$ -Tubulina y de carga mitocondrial la proteína Hsp60.

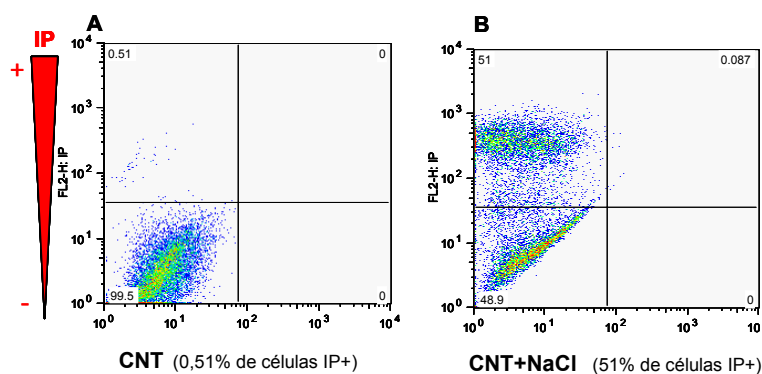
Teniendo en cuenta la banda de 55kDa detectada en el *Western Blot*, que se cree que corresponde con el tamaño del monómero del CRT1, los resultados muestran una disminución significativa de la cantidad de proteína CRT1 con respecto a la detectada en células control en los fibroblastos de los P-1 y P-3 relativizada con la expresión de la proteína  $\alpha$ -Tubulina, mientras que P-4 y P-6 muestran la mayor expresión relativa (Fig.28). Estos resultados concuerdan con los niveles de expresión de los transcritos cuantificados anteriormente.

## 4.6 ANÁLISIS DEL IMPACTO DE LOS DEFECTOS EN CREATINA CEREBRAL SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR

Se ha analizado el impacto de los mutantes naturales de CDS sobre el metabolismo energético celular valorando distintos parámetros relacionados con estrés metabólico: **1)** Estudio de viabilidad celular **2)** Contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) **3)** Activación de p38MAPK **4)** Medida de apoptosis celular **5)** Progresión del ciclo celular **6)** Activación p53 **7)** Medida de los niveles de Cr intracelular.

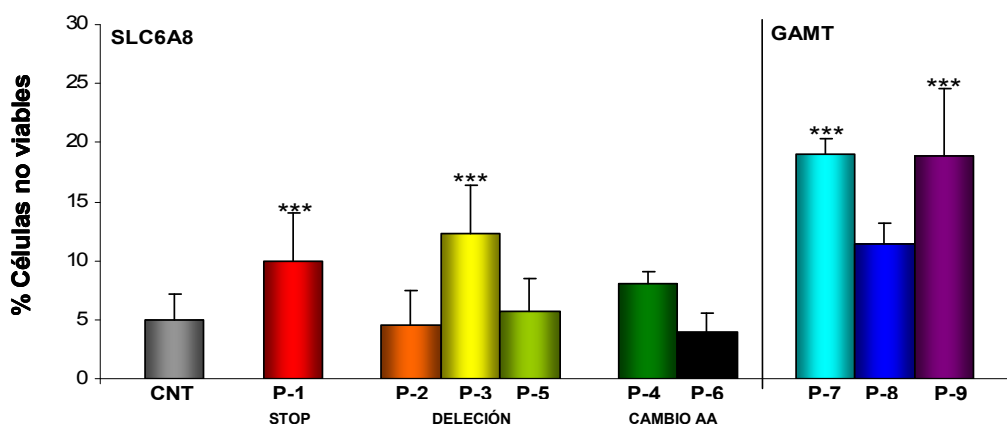
### 4.6.1 Estudio de viabilidad celular

Se cuantificó la proporción de células viables y no viables mediante la tinción vital de incorporación de Ioduro de propidio (IP) ( $C_{27}H_{34}N_{412}$ ) por citometría de flujo. Los estudios se realizaron en las líneas celulares de pacientes CDS y de individuos control. Se seleccionaron las células permeables a IP mediante crecimiento de fibroblastos en condiciones normales o en presencia de NaCl 2M para provocar la rotura de la membrana plasmática por choque osmótico (Fig.29). El cuadrante superior izquierdo refleja el porcentaje de células no viables en el cultivo.



**Fig.29: Estudio de viabilidad en fibroblastos mediante citometría de flujo. A)** Células control con IP. **B)** Células tratadas con NaCl 2M y IP. En cada cuadrante se indica el porcentaje de células incluidas en él.

Con estas condiciones de compensación se analizaron las líneas celulares de los pacientes y los resultados se representan como porcentaje de células no viables en la Figura 30.

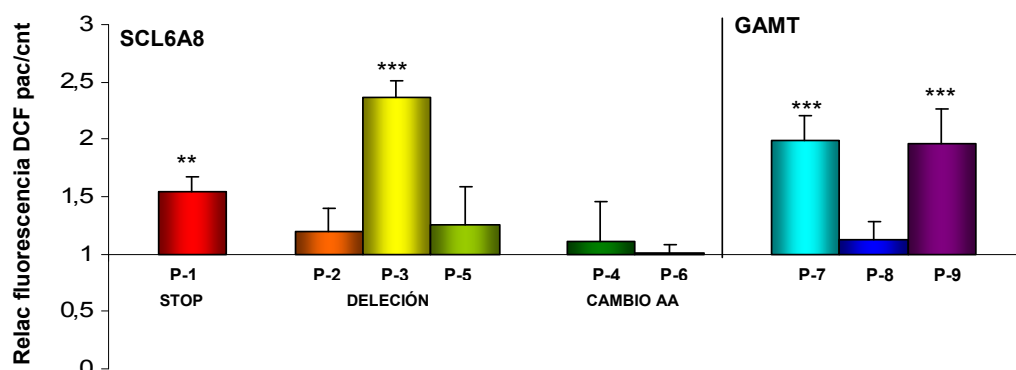


**Fig.30: Porcentaje de células no viables en fibroblastos de pacientes CDS.** Se cuantificaron mediante citometría de flujo con tinción IP. En el eje x se representan las líneas de fibroblastos de los pacientes ordenadas según el tipo de mutación y de controles (n=3), y en el eje y el % de células no viables. Se midieron 10.000 eventos celulares por muestra, se midieron por triplicado y cada línea celular se ensayó al menos 2 veces. Los datos fueron analizados con el programa FlowJo 6.4.2 (Mac). \*\*\*p<0,001.

Las líneas de los pacientes P-1 y P-3 (SLC6A8), P-7 y P-8 (GAMT) tienen un aumento muy significativo del porcentaje de células no viables (10-20%) con respecto a la media de controles y al resto de pacientes.

#### 4.6.2 Contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno

Basándonos en experimentos previos que mostraban una relación entre la administración de Cr y la prevención en la formación de ROS en otras patologías, se han analizado los niveles intracelulares de ROS en células de los pacientes CDS mediante citometría de flujo utilizando la sonda apolar H<sub>2</sub>DCFDA (2'7'Diacetato de fluoresceína) que detecta principalmente peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Se utilizó también IP como marcador de viabilidad celular. Los resultados de la medida de ROS en las líneas celulares de los pacientes se muestran a continuación en forma de histograma (Fig.31).

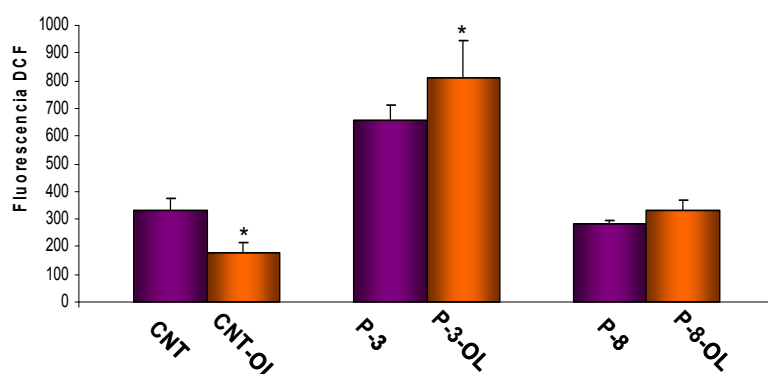


**Fig.31: Contenido intracelular de ROS en líneas de pacientes CDS.** En el eje x las líneas de fibroblastos de los pacientes (pac) y en el eje y se representa la fluorescencia relativa de DCF de la línea celular del paciente con respecto a la media de controles (n=6) (cnt). Se midieron al menos 10.000 eventos celulares por muestra, cada muestra se midió por triplicado en cada ensayo y cada línea celular se ensayó al menos 2 veces. El valor 1 corresponde a la media de controles. Los datos obtenidos en el citómetro de flujo FACScalibur fueron analizados con el programa de análisis informático FlowJo Versión 6.4.2 (Mac) \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Los resultados obtenidos mostraron niveles significativamente aumentados de ROS en P-1, P-3, P-7 y P-9. Estos datos se corresponden también con las líneas primarias con los mayores porcentajes de células no viables.

#### • Efecto de la oligomicina sobre los niveles de ROS

La mitocondria se ha descrito como la fuente intracelular más importante en la producción de ROS. Por ello, para evaluar si la procedencia de las ROS era eminentemente mitocondrial, se incubaron las células de dos pacientes elegidos bien por presentar niveles de ROS altos (P-3) o bajos (P-8) con oligomicina 6 $\mu$ M durante 1 hora y se cuantificó su efecto sobre la producción de ROS. La oligomicina, que actúa específicamente bloqueando el canal de protones en la fracción  $F_0$  de la ATP sintasa e inhibiendo por tanto la fosforilación oxidativa (Shchepina, et al., 2002), provocaría la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna y el consiguiente aumento del ROS, si éste fuese su origen.



**Fig.32: Efecto de la oligomicina sobre la producción de ROS.**

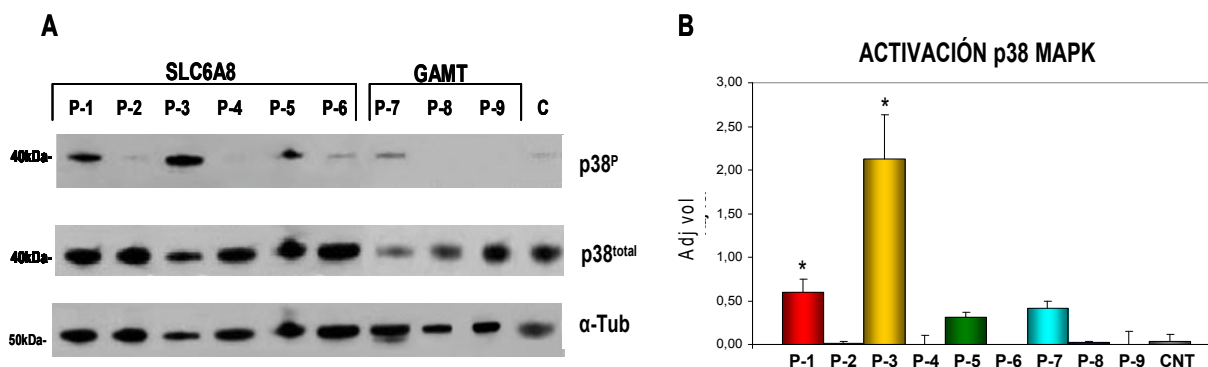
Las células control y de los pacientes se incubaron con oligomicina 6 $\mu$ M durante 1 hora para la determinación de ROS. En el eje Y se representa la fluorescencia DCF y en el eje X las líneas de fibroblastos de los distintos pacientes y de controles (n=2). Los datos corresponden a la media de 2 experimentos independientes por triplicado. Se realizó en un citómetro de flujo FasCanto. \* $p < 0,05$ .

Como reflejan los resultados obtenidos, el efecto de la oligomicina sobre los niveles de ROS parece ser diferente en las células de pacientes y controles. En las líneas control la oligomicina disminuye los niveles de ROS, mientras que en los fibroblastos de pacientes los aumenta (Fig.32).

### 4.6.3 Activación de p38MAPK

Debido a la implicación de las proteínas quinasas activadas por mitógeno en las rutas apoptóticas y su relación directa con el estrés oxidativo, hemos analizado la posible activación de p38MAPK en fibroblastos de los pacientes y en líneas control medida como el aumento en la relación p38-fosforilada/p38-total mediante *Western blot*.





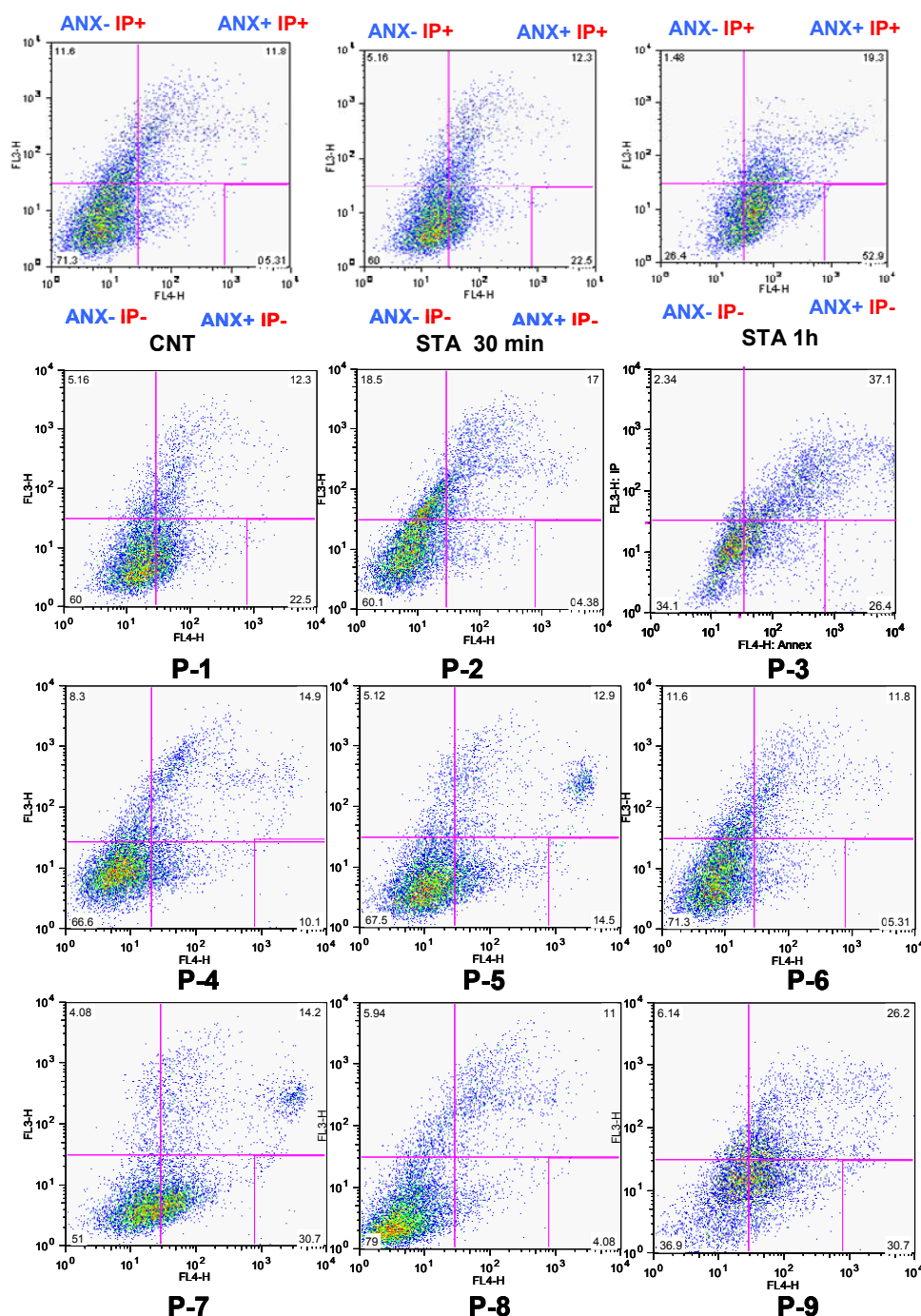
**Fig.33: Activación de la p38MAPK.** **A)** WB representativo de la expresión de p38-fosforilada, p38-total y  $\alpha$ -Tubulina en las líneas de fibroblastos de pacientes y control. **B)** Gráfico que representa la relación p38-fosforilada/p38-total media de tres WB con réplicas biológicas diferentes, (CNT) corresponde a la media  $\pm$  DE de 3 líneas control diferentes. Las bandas fueron densitometradas con el programa Quantity one en un densitómetro de Bio Rad. Se representa la razón de la expresión de cada proteína respecto a su control de carga como densidad óptica por  $\text{mm}^2$  restando a cada banda el fondo. \* $p < 0,05$ .

Los resultados muestran que las líneas P-1 y P-3 muestran una activación de p38 estadísticamente significativa ( $>10$  veces) (Fig.33A y B).

#### 4.6.4 Medida de apoptosis celular

Para evaluar si los niveles elevados de ROS podrían inducir apoptosis, se investigó el porcentaje de células anexina V positivas por citometría de flujo utilizando una tinción dual de Anexina y IP. Este método permite analizar el tipo de apoptosis, así las células Anexina V-positivas/IP-negativas se consideran células apoptóticas tempranas, y las células Anexina V-positivas /IP-positivas se seleccionan como apoptóticas tardías o necróticas. En la Figura 34 se muestran los resultados de un experimento tipo de la medida de Anexina V en los fibroblastos de pacientes CDS. En la fila superior se muestra así mismo, la evolución de una población celular de fibroblastos control tras ser tratada con estaurosporina 2  $\mu\text{M}$  durante 30 ó 60 min. La estaurosporina es un inhibidor de quinasas de amplio espectro, que induce apoptosis y por tanto va a actuar desplazando la masa celular desde el cuadrante **ANX- IP-** hasta los cuadrantes de apoptosis temprana (**ANX+ IP-**) y apoptosis tardía (**ANX+ IP+**) en forma dependiente de tiempo de incubación. También, en las líneas celulares de los P-1, P-3, P-7 y P-9 la población celular se desplazó hacia el cuadrante de (**ANX+ IP-**) siendo al menos un 16% superior a la detectada en el control.



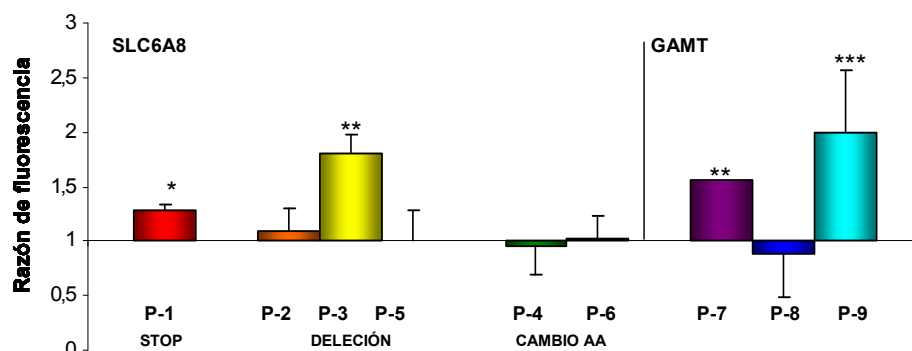


**Fig.34: Análisis de apoptosis temprana y tardía con Anexina-V en pacientes CDS mediante citometría de flujo.** CNT: Línea control, STA: Estaurosporina. En el eje x se representa la fluorescencia de la sonda Annexin V-DY634 y en el eje y la fluorescencia del IP. En el cuadrante inferior izquierdo se representa el porcentaje de las células viables (-), en el superior izquierdo las células no viables (+), en el inferior derecho las células apoptóticas tempranas (+) y en el superior derecho se representan las células apoptóticas tardías (+).

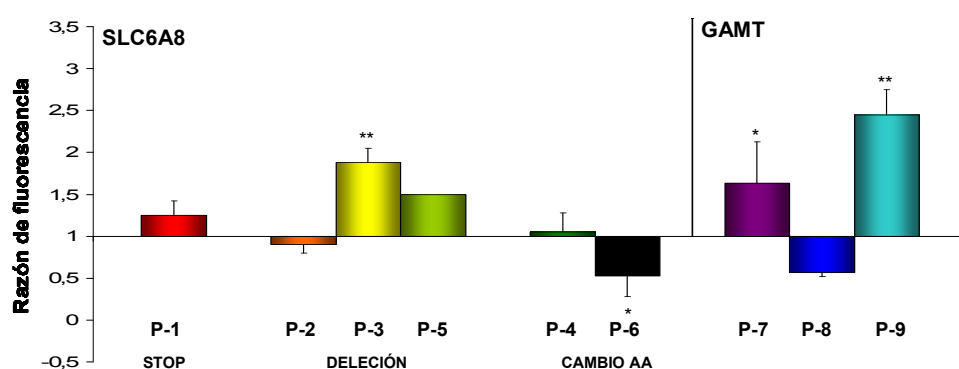
En la Figura 35 se compendian todos los experimentos realizados representando el porcentaje de células del cuadrante inferior derecho (ANX+ IP-), células que sufren apoptosis temprana (Fig.35A) y las células en el cuadrante superior derecho que sufren apoptosis tardía o necrosis, (ANX+ IP+) (Fig.35B). Se observa un incremento de 1.3-2 veces

en el porcentaje de células en apoptosis temprana (ANX+ IP-) y de 1.25-2.5 veces en el porcentaje de apoptosis tardía (ANX+ IP+) en los P-1, P-3, P-7 y P-9. Los resultados indican que los fibroblastos de los pacientes CDS con niveles de ROS elevados también presentan un aumento de apoptosis temprana y tardía.

#### A APOPTOSIS TEMPRANA ANX + IP-



#### B APOPTOSIS TARDÍA ANX + IP +



**Fig.35: Histogramas de la medida de Anexina-V obtenido mediante citometría de flujo en fibroblastos de pacientes CDS.** En el eje x se representan las líneas de fibroblastos de los pacientes y en el eje Y se representa la razón de fluorescencia de la sonda Annexin V-DY634 de cada línea respecto a la media de controles (n=5). Se midieron al menos 10.000 eventos celulares por muestra, cada muestra se midió por triplicado en cada ensayo y cada línea celular se ensayó al menos 2 veces. El valor de RQ =1 corresponde a la media de controles. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa de análisis informático FlowJo Versión 6.4.2 (Mac) \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

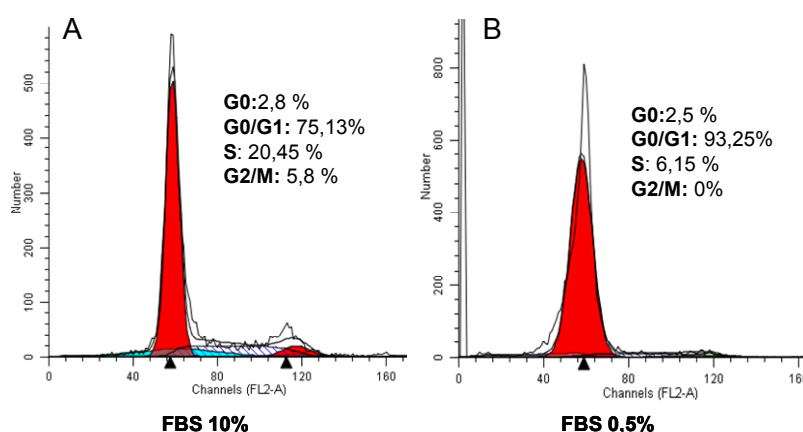
### 4.6.5 Progresión del ciclo celular

Las células apoptóticas poseen un menor contenido de DNA, y por tanto pueden ser detectadas con tinciones de DNA como poblaciones que muestran menor intensidad de la señal (fase sub-G0/G1 o G0). La distribución celular de las poblaciones estudiadas se analizó por citometría de flujo utilizando marcaje con IP que incrementa su fluorescencia tras su unión al ácido nucleico. Su utilización para la determinación del contenido de DNA requiere de la utilización de agentes permeabilizantes y del tratamiento con RNAasa. La

cantidad de colorante unido es proporcional a la cantidad de DNA, y por tanto la luz recogida en el citómetro es proporcional a la cantidad de DNA en cada célula.

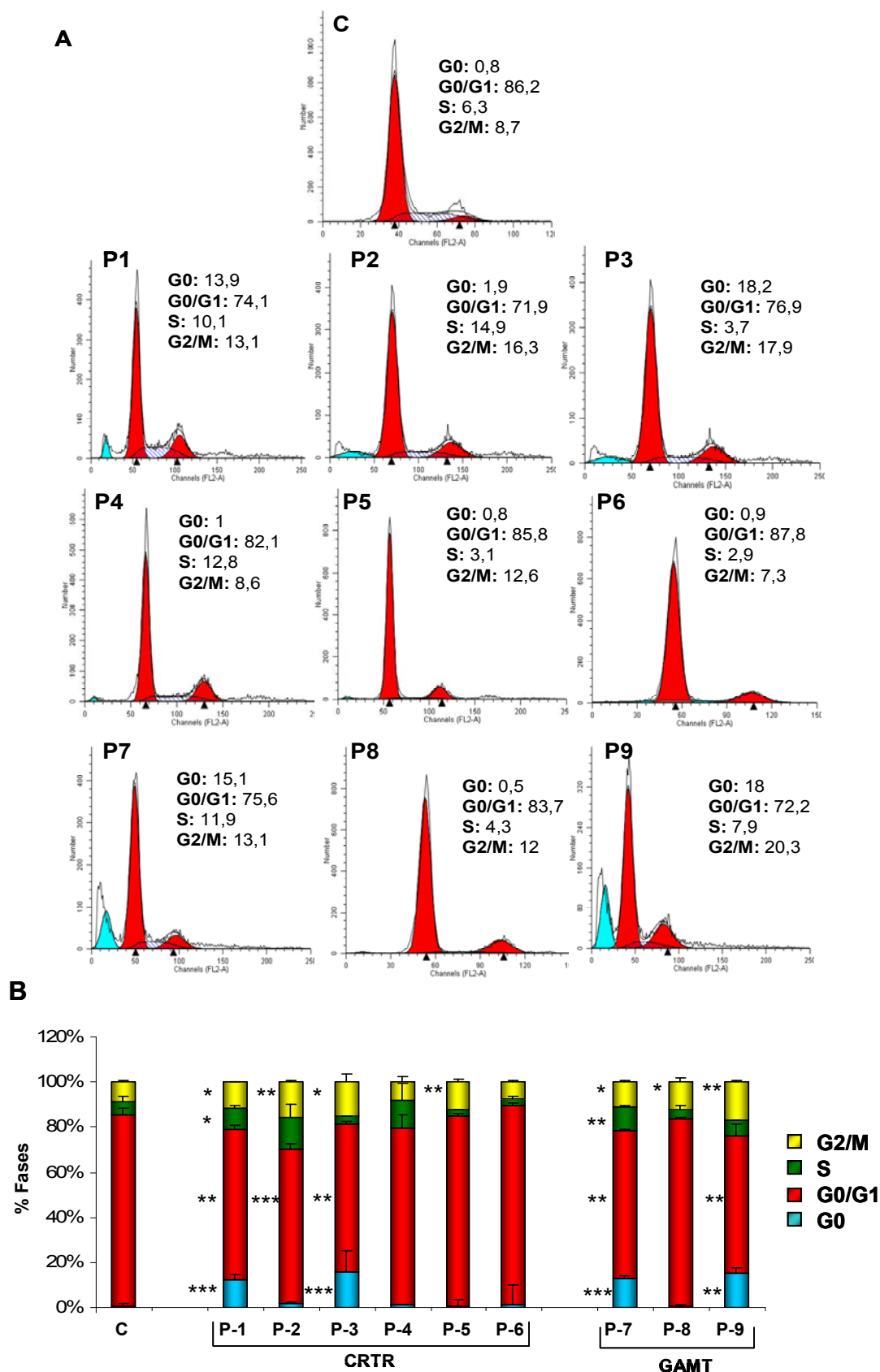
Los resultados del análisis del ciclo celular se representan en forma de histogramas de intensidad de fluorescencia de la sonda específica de DNA. Los histogramas de contenido de DNA de células de mamífero se caracterizan por tener tres poblaciones o regiones definidas; dos curvas gaussianas correspondientes a los picos con intensidad G0/G1 (2C) y G2/M (4C); y una región intermedia correspondiente a la población en fase S. Para cuantificar, de manera exacta, la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular, se han utilizado modelos matemáticos que permiten ajustar curvas gaussianas a la distribución de las poblaciones G0/G1 y G2/M, y calcular el área de dichas distribuciones de forma precisa.

Para este análisis, todas las líneas de fibroblastos fueron sincronizadas en fase G0/G1 eliminando el suero del medio de cultivo (0,5%FBS). La restricción de FBS provoca una acumulación de células en fase G0/G1 que pasan del 75,13 al 95,25% y una disminución de las fases S y G2/M. (Fig.36).



**Fig.36: Histogramas de la distribución celular obtenida por citometría de flujo en una línea de fibroblastos control. A) Células incubadas con MEM + 10%FBS. B) Células incubadas con MEM + 0,5% FBS.** En el eje x se representa la cantidad de DNA, y en el eje y el número de células en cada fase. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa de análisis informático Modfit v2.0

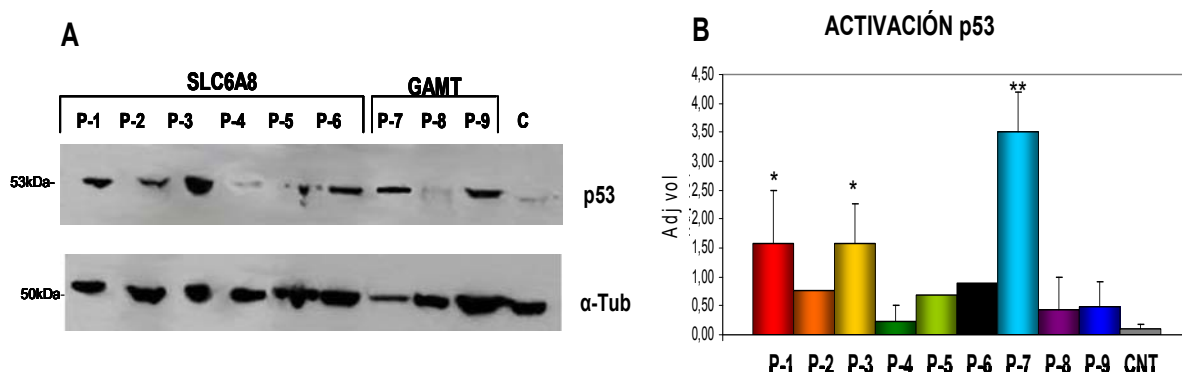
La adición posterior de suero permitió que avanzaran hacia las distintas fases del ciclo. El análisis del ciclo celular en estas condiciones, mostró que la mayoría de las líneas de los pacientes poseían un patrón de ciclo celular alterado con respecto al de los controles (Fig.37). Igualmente se observa en las líneas P-1, P-3, P-7 y P-9 un porcentaje muy significativo de células con menor fluorescencia que las de la fase G0/G1 y que se clasifican como sub-G0/G1 o G0, es decir consideradas apoptóticas ( $14 \pm 2$  % en P-1,  $18 \pm 11$  % en P-3,  $15 \pm 0,9$  % en P-7 y  $18 \pm 2,7$  % en P-9).



**Fig.37: Análisis del ciclo celular.** A) Histograma de la distribución celular en un experimento tipo de cada una de las líneas de fibroblastos de pacientes y un control. En el eje x se representa el contenido de DNA y en el eje y el número de células en cada fase del ciclo. Se indican los porcentajes de células en cada fase. B) Gráfica de la distribución celular de las líneas celulares de pacientes y controles. En el eje x se representan las líneas de fibroblastos de los pacientes ordenados según el tipo de mutación y la media de controles (n=6), y en el eje y el % de células cada una de las fases del ciclo. Los datos son media  $\pm$  DE de 3 experimentos independientes con duplicados. Los datos fueron obtenidos del citómetro de flujo FasCanto y analizados con el programa de análisis informático Modfit v2.0. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 4.6.6 Activación de p53

La proteína p53 está implicada en la regulación de genes relacionados con la apoptosis y crecimiento celular en respuesta a situaciones de estrés, por tanto tiene una relación directa con la muerte celular programada, la diferenciación celular y los mecanismos de control del ciclo celular. Por estos motivos se analizó mediante *Western blot* la posible activación de esta proteína. Los resultados indican una inducción significativa de p53 en los fibroblastos de los pacientes P-1, P-3 y P-7 (Fig.38).



**Fig.38: Activación de p53.** **A)** WB representativo de la expresión de p53 y  $\alpha$ -Tubulina en las líneas de fibroblastos de pacientes y un control. **B)** Gráfico que representa la relación p53/  $\alpha$ -Tubulina media de tres WB. Las bandas fueron densitometradas con el programa Quantity one en un densitómetro de Bio Rad. Se representa la razón de la expresión de cada proteína respecto a su control de carga como densidad óptica por  $\text{mm}^2$  restando a cada banda el fondo. CNT: representa la media  $\pm$  DE de 3 líneas control. \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.6.7 Medida de los niveles intracelulares de Cr

Se cuantificaron los niveles endógenos de Cr en fibroblastos de los pacientes con el fin de valorar si existen diferencias apreciables de los niveles de Cr según el gen afectado y según la variación nucleotídica para así intentar encontrar una relación entre la expresión de los genes del metabolismo de la Cr y los niveles internos de ésta que pudieran correlacionarse con las distintas manifestaciones fenotípicas de la enfermedad.

**Tabla 22: Niveles de Cr endógena en fibroblastos de pacientes y controles**

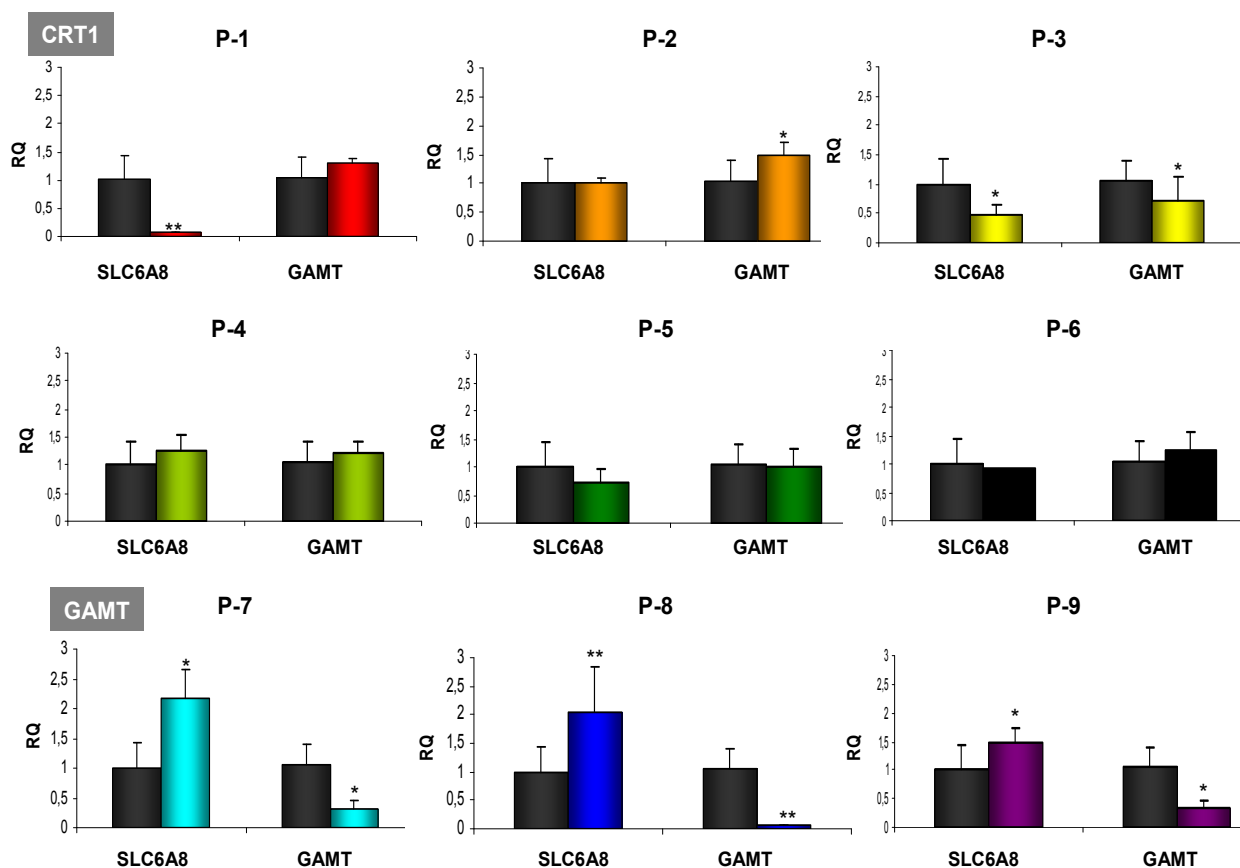
Línea celular	Defecto	Niveles Cr pmol/ $\mu$ g prot
P-1	CRT1	0,60 $\pm$ 0,08
P-2	CRT1	0,55 $\pm$ 0,07
P-3	CRT1	0,85 $\pm$ 0,35
P-4	CRT1	2,30 $\pm$ 0,001
P-5	CRT1	0,60 $\pm$ 0,14
P-6	CRT1	0,85 $\pm$ 0,07
P-7	GAMT	10,0 $\pm$ 0,9
P-8	GAMT	20,8 $\pm$ 4,2
Controles (n:9)		15,3 $\pm$ 6,8

La medida se realizó mediante MS-MS. Los valores son media  $\pm$  DE de al menos dos ensayos por duplicado. Los controles son media de 9 líneas celulares

Todas las líneas celulares con deficiencia en el transportador de Cr (SLC6A8) independientemente de su genotipo muestran niveles muy disminuidos de Cr intracelular (<6% de los niveles de las líneas control), excepto el P-4 (15,8%). Mientras que las dos líneas de GAMT estudiadas tienen niveles similares a la media de controles (Tabla 22). De los datos obtenidos se desprende que el transporte de Cr es la ruta principal para mantener la homeostasis de Cr en fibroblastos.

## 4.7 PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES SLC6A8 Y GAMT

Tras conocer la concentración de Cr intracelular y observar la clara diferencia existente entre las líneas celulares CRT1 y GAMT se pretendió comprender si este hecho podía reflejar una adaptación metabólica de las distintas líneas celulares para mantener la homeostasis de creatina. Por ello, se valoró la abundancia relativa de los transcritos implicados en la síntesis de transportador CRT1 (SLC6A8) o en la síntesis endógena de Cr (GAMT y AGAT) en todas las líneas celulares de pacientes CDS mediante qRT-PCR. En el caso del gen AGAT la expresión en fibroblastos se encontraba reducida incluso no detectable en algunos casos (datos no mostrados). En la Figura 39 se representan las cantidades relativas de transcritos de cada línea celular y de la media de fibroblastos control.



**Fig.39: Perfil de expresión de los genes del metabolismo de la Cr cuantificados mediante qRT-PCR en fibroblastos CDS.** En el eje x se representa el RQ y en el eje y se representan los distintos genes. En gris se representa el valor de los controles y en color cada paciente. Los datos corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes con triplicados  $\pm$  DE. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ .

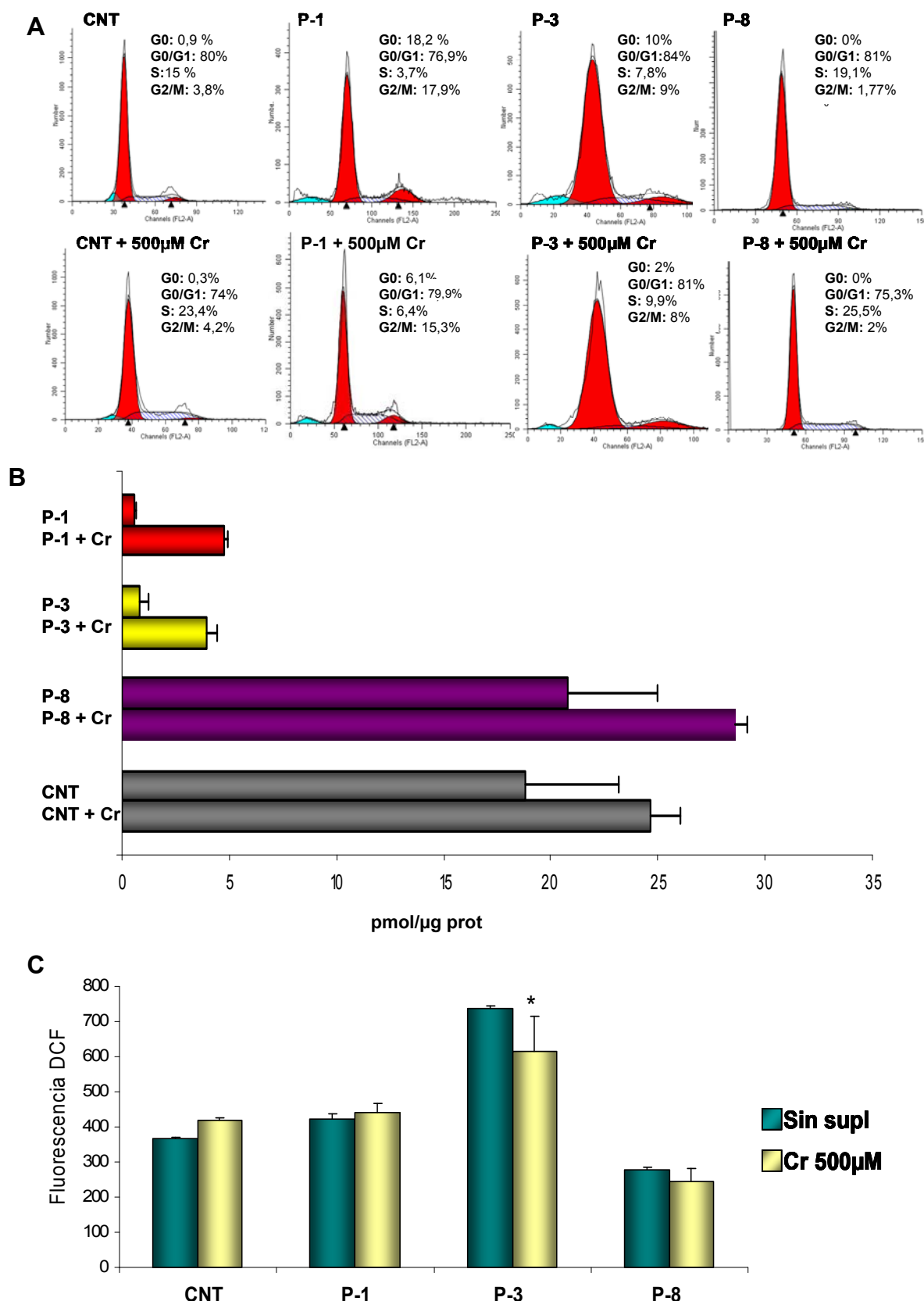
Los resultados indican que existen perfiles de expresión muy diferentes entre las líneas de los pacientes SLC6A8. Así, las células del P-3 son las únicas que presentan una disminución significativa en la expresión de ambos genes. Los pacientes P-1, P-2, P-4 y P-6 presentan un aumento en la expresión de GAMT aunque sólo es significativo en el P-2. Como se ha comentado anteriormente el P-4 es el único paciente CRT1 que presenta niveles de expresión de SLC6A8 incluso superiores a los controles.

En las células de los tres pacientes GAMT se observa un perfil similar con disminuciones drásticas en los niveles de GAMT e incrementos significativos de la expresión de SLC6A8.

#### **4.8 EFECTO DE LA CREATINA SOBRE PARÁMETROS DE ESTRÉS METABÓLICO**

Como la Cr juega un papel esencial en el metabolismo energético mitocondrial y también se le atribuye un papel como captador de protones que podría ayudar a prevenir el estrés oxidativo, se plantearon varios ensayos tipo para intentar comprender si las alteraciones observadas en algunas líneas celulares se deben a un efecto directo de la deficiencia de Cr.

Se realizaron análisis simultáneos del efecto de la incubación con Cr 500 $\mu$ M en células sincronizadas sobre: la progresión del ciclo celular, los niveles intracelulares de Cr y los niveles intracelulares de ROS. Esta vez se amplió el tiempo de incubación con Cr a 24h. Para este estudio se seleccionaron las líneas celulares P-1 y P-3 con deficiencia en CRT1 por sus altos niveles de ROS intracelular y por su elevado porcentaje de células en fase sub-G0/G1 (G0 en los gráficos), así como la línea P-8 de deficiencia de GAMT por sus bajos niveles de ROS. Los resultados se muestran en la Figura 40.



**Fig.40: Estudio del efecto del suplemento con Cr 500µM en las líneas de fibroblastos P-1, P-3, P-8 y un control. A)** Distribución celular en las distintas fases del ciclo. En el eje x se representa la medida de fluorescencia de DCF y en el eje y las distintas líneas estudiadas. Se indican los porcentajes de células en cada fase. Analizado con Modfit v2.0 **B)** Medida de Cr endógena en fibroblastos mediante MS-MS. En el eje x se representan los niveles de Cr en pmol/µg prot y en el eje y las distintas líneas celulares con y sin Cr y la media de las líneas control (n=3). **C)** Niveles de ROS intracelular. En el eje x se representan las líneas de los pacientes y la media de controles (n=3) y en el eje y se representa el la fluorescencia DCF. Los datos corresponden a la media de 2 experimentos independientes por triplicado ± DE. Los datos fueron obtenidos del citómetro de flujo FACSanto. \*p<0,05.



Las células sincronizadas tal y como se describe en la sección 3.2.2 de Material y Métodos, se incubaron durante 24h en ausencia o presencia de Cr 500  $\mu$ M.

En los estudios de ciclo celular se observa, asociada a la incubación con Cr, una disminución significativa de la población celular en fase sub-G0/G1 (G0) o células apoptóticas y un aumento en las fases S y G2/M en las líneas de los pacientes P-1 y P-3 (Fig.41A).

En el estudio de medida de Cr intracelular se observa que las líneas con deficiencia en CRT1 (P-1, P-3) sufren un aumento de los niveles de Cr endógena al ser incubadas en presencia de Cr 500 $\mu$ M (7,9 y 4,6 veces) respectivamente, sin llegar al rango de controles. Estos incrementos son todos ellos superiores a los medidos en las líneas control (1,3 veces) y en la línea GAMT (P-8) (2,4 veces) (Fig. 41B).

En la medida de los niveles de ROS sólo se observa una disminución en el paciente P-3 (Fig.41C).

Tras estos resultados podemos afirmar que la suplementación con Cr actúa facilitando el avance en las fases del ciclo celular y disminución de células en fase sub-G0/G1 (G0) pero tiene un efecto muy limitado en la reducción de los niveles de ROS.

## **4.9 CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO**

Una vez estudiados los defectos de Cr cerebral desde diferentes aproximaciones, el objetivo final de este trabajo ha sido integrar todos los resultados obtenidos para cada paciente e intentar sacar conclusiones que permitan ampliar el conocimiento de estos síndromes e intentar encontrar una posible correlación fenotipo-genotipo.

En la Tabla 23, junto a los genotipos de cada pacientes, se resumen todas las determinaciones realizadas en los fibroblastos de los pacientes de CDS; %de transporte de Cr medido a 25  $\mu$ M de Cr extracelular o actividad GAMT siempre referido a los valores medios determinados para individuos sanos; cantidad relativa de transcritos SLC6A8 y GAMT; incrementos de ROS y apoptosis temprana, porcentaje de células en sub G0/G1(G0) y no viables; niveles de Cr intracelular y expresión de las proteínas de señalización celular activadas por estrés.

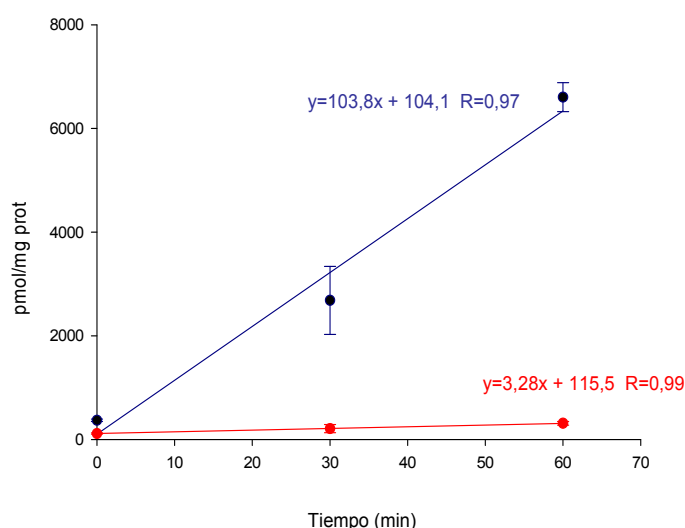
Tabla 23: Resumen de las determinaciones realizadas de los pacientes CDS

Pac	Def	Genotipo/ Efecto proteína	Trans Cr / Activ GAMT %	Perfil transcripcional RQ		ROS ratio pac/cnt	Anx+ IP- ratio pac/cnt	cel G0 %	Cel no viabiles %	Cr Intracel pmol/μg prot	p38 ratio p38-P/p38t	p53 ratio p53/tub	Fenotipo clínico
				GAMT	SLC6A8								
P-1	CRT1	c.462G>A p.W154X	5,5	1,3	0,07**	1,5***	1,3*	14***	11*	0,6*	0,9*	1,5*	GRAVE
P-2	CRT1	c.1006_1008AAC p.N336del	6,4	1,5*	1	1,2	1,1	1	4,5	0,5*	0,07	0,7	GRAVE
P-3	CRT1	c.1079_1081delTCT p.F360del	15	0,7*	0,5*	2,4***	1,8**	18**	12*	0,8*	1,6*	1,5*	GRAVE
P-4	CRT1	c.1210G>C p.A404P	7,8	1,1	1,2	1,1	0,9	0,9	6	2,3*	0	0,2	LEVE
P-5	CRT1	c.1222_1224delTTC p.F408del	19	1	0,7	1,3	1	0,8	8	0,6*	0,4	0,6	GRAVE
P-6	CRT1	c.1396G>A p.G466R	7,3	0,9	0,9	1	1,1	0,9	4	0,8*	0,1	0,7	GRAVE
P-7	GAMT	c.[59G>C]+[521G>A] p.[W20S]+[.W174X]	2,8	0,3*	2*	1,9***	1,5**	15***	20*	10	0,3	3,5*	GRAVE
P-8	GAMT	c.[145delT]+[145delT] p.[Y49fs]+[Y49fs]	3,7	0,06**	2**	1,1	0,8**	0,5	10	20,8	0,01	0,4	GRAVE
P-9	GAMT	c.[316C>T]+[407C>T] p.[Q106X]+[T136M]	4,1	0,3*	1,5*	1,9**	2**	18**	19*	N/E	0,07	0,5	GRAVE
CNT	-	-	100	1	1	1	1	0,8	5	15,3	0,07	0,09	-

Pac: Paciente, Def: Defecto, Trans: Transporte, Cnt: Control, Cel: Células, ANX: Anexina. N/E: No estudiado. \* $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . % Transporte de Cr con respecto a los valores determinados en fibroblastos control. RQ Las desviaciones estándar no se indican en la tabla pero la mayoría son inferiores al 10% y se pueden encontrar en los ensayos correspondientes. Referencia de las secuencias en GeneBank: NM\_005629.3 para SLC6A8 y NM\_000156.4 para GAMT.

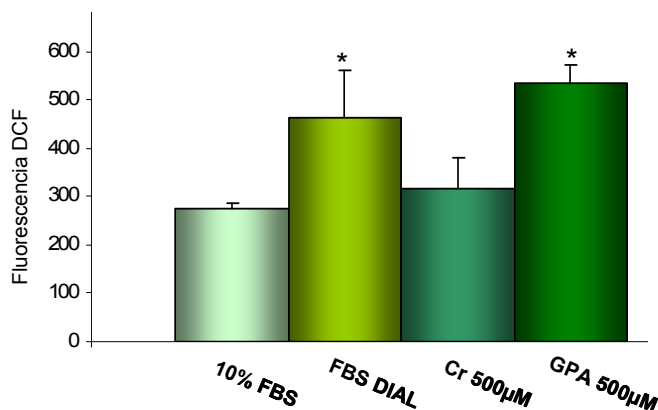
## 4.10 PERSPECTIVAS FUTURAS

Hasta ahora todos los experimentos han sido realizados en fibroblastos de piel cultivados. Pero una manera de aproximarnos más a la naturaleza de estos síndromes sería conseguir un modelo celular cerebral que nos permitiese abordar el estudio de la patología y en él poder inhibir con RNA interferente (RNAi) los genes correspondientes para estudiar su efecto. De los distintos tipos celulares de cerebro existentes, neuronas y células gliales (astrocitos, oligodendrocitos, células ependimales y microglía) hemos iniciado estudios en la línea celular establecida U87 procedente de glioblastoma humano. Para confirmar si existía un transporte activo de Cr en dicha línea, se realizaron estudios de transporte total de Cr (con el método anteriormente comentado) a 25  $\mu\text{M}$  de Cr, analizando su linealidad respecto al tiempo de incubación y su inhibición por GPA 500 $\mu\text{M}$ . Los resultados del estudio confirmaron la existencia de transporte activo de Cr en este tipo celular (Fig.42).



**Fig.42: Transporte de Cr a 25 $\mu\text{M}$  en glioblastoma humano. Estudio de la linealidad respecto al tiempo e inhibición por GPA.** En el eje x se representa el tiempo en minutos y en el eje y el transporte (pmol/mg prot). Los resultados son la media  $\pm$  DE de 2 ensayos independientes. Transporte total (azul), Transporte bajo el efecto del GPA 500  $\mu\text{M}$  (rojo).

Para intentar comprender los aumentos de ROS observados en algunas líneas celulares de pacientes CDS y conocer si se deben a un efecto directo de la deficiencia de Cr se planteó el siguiente ensayo tipo. Se incubaron las células U87 en 4 condiciones de cultivo diferentes durante 4 horas: En medio basal, en medio deplecionado de Cr, en medio suplementado con Cr 500 $\mu\text{M}$  y en medio con GPA para inhibir el transporte de Cr. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 43.



**Fig.43: Niveles de ROS en células gliales U87 mediante citometría de flujo**

Se incubaron durante 4 horas en: medio basal (10%FBS), medio con suero dializado (FBS DIAL 10%), medio suplementado con Cr (Cr 500µM) y medio con GPA (GPA 500 µM). En el eje *y* se representa la fluorescencia de la sonda H<sub>2</sub>DCFDA y en el eje *x* los distintos tratamientos. Se midieron al menos 10.000 eventos celulares por muestra, cada muestra se midió por triplicado en cada ensayo y cada línea celular se ensayó al menos 2 veces. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa de análisis informático FlowJo 6.4.2 (Mac). \**p*<0,05.

Se observa un aumento estadísticamente significativo de los niveles de ROS cuando se incubaron las células con medio deplecionado de Cr respecto al medio basal. Estos niveles disminuyen al adicionar Cr 500µM. El tratamiento con GPA 500µM mostró también un aumento significativo de los niveles intracelulares de ROS. Debemos tener en cuenta que las células U87 tienen síntesis endógena de Cr y los niveles de Cr intracelulares no se habrán reducido totalmente, quizás los aumentos de ROS serían mayores en ausencia total de Cr. Estos resultados sugieren, al menos en parte, que la deficiencia de Cr, podría causar el estrés observado en los fibroblastos de algunos pacientes.

## 5. DISCUSIÓN





En este trabajo se recoge el estudio genético de nueve pacientes de síndrome de deficiencia de creatina cerebral y se analiza el impacto de los alelos mutantes identificados no sólo sobre la actividad de las proteínas correspondientes sino también sobre los distintos aspectos relacionados con el metabolismo energético celular. El estudio se ha realizado en fibroblastos de pacientes y tiene como última finalidad integrar todos los conocimientos y tratar con ello de encontrar nuevas aproximaciones diagnósticas y estrategias terapéuticas.

## **5.1 DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES**

Desde el descubrimiento del primer caso de deficiencia de GAMT en 1994 y los primeros casos de deficiencia del transportador de Cr (SLC6A8) y AGAT en el 2001 investigadores clínicos y bioquímicos han colaborado en la identificación de más de 200 pacientes con estos defectos.

Los pacientes con defectos en el metabolismo de la Cr se caracterizan por una disminución o ausencia de Cr en cerebro que se detecta por  $^1\text{H}$ -MRS. Sin embargo, esta técnica de neuroimagen no está disponible en todos los hospitales, además, dada la heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de estos defectos es necesaria la puesta a punto de diversas técnicas bioquímicas y genéticas para llegar a un diagnóstico certero.

Por ello, se ha desarrollado un algoritmo diagnóstico que abarca diferentes pasos: tras una preselección clínica, el estudio bioquímico mediante cuantificación de los metabolitos marcadores en fluidos biológicos permite sospechar o descartar este síndrome. Antes de continuar con los estudios moleculares, es importante confirmar la deficiencia cerebral de Cr mediante  $^1\text{H}$ -MRS, el defecto enzimático de AGAT o GAMT determinando la actividad enzimática en fibroblastos o linfoblastos, y para el estudio del defecto de SLC6A8 se mide el transporte de Cr. Finalmente el estudio de las mutaciones en los genes AGAT, GAMT y SLC6A8 completa el diagnóstico.

En nuestro caso se realizó un rastreo (niveles de GAA y la relación Cr/Crn) en fluidos fisiológicos de pacientes remitidos desde **1)** Hospitales de la Comunidad de Madrid y de otras comunidades autónomas para el estudio de enfermedades metabólicas hereditarias incluyendo también casos con comportamiento autista y **2)** Instituciones para personas con retraso mental.

Tras la experiencia de los más de cinco mil pacientes analizados se han acotado fiablemente los niveles de corte de los metabolitos considerados patológicos, aunque es necesario confirmar al menos en dos muestras diferentes la persistencia de los niveles alterados, llevar un control sobre la dieta del paciente previo al día de la determinación (que puede falsear los resultados) (Arias, et al., 2007) así como conocer su medicación y el

estado clínico del mismo. De los **17** individuos preseleccionados con sospecha de presentar un defecto en el metabolismo de la Cr por haber presentado previamente niveles alterados de Cr o GAA en fluidos fisiológicos, finalmente se confirmó un defecto de deficiencia de Cr cerebral en **9** de ellos (**6** en CRT1 y **3** en GAMT). Durante la preparación de esta memoria se ha diagnosticado otro caso de deficiencia en CRT1 que no ha sido incluido en los resultados.

Para la confirmación del diagnóstico en pacientes con defectos en la proteína CRT1, hemos desarrollado en este trabajo un método radiactivo con [4-<sup>14</sup>C] creatina, que a diferencia de los métodos empleados de forma habitual (GC-MS) para caracterizar el transporte de Cr (Arias-Dimas, et al., 2006; Salomons, et al., 2001) o la sobre-expresión de alelos mutantes (Rosenberg, et al., 2007), nos permite trabajar a velocidades iniciales y así calcular las constantes cinéticas del transporte y sus posibles variaciones asociadas a las mutaciones identificadas en los pacientes. Este método, además de confirmar un transporte deficiente (<20%) en **6** de los pacientes con aumentos persistentes de la relación Cr/Crn en orina, ha permitido calcular las constantes cinéticas en fibroblastos control, constatando que los parámetros determinados se encuentran en el rango de los previamente descritos en la línea celular establecida HEK-293 (Straumann, et al., 2006), y por último estudiar el perfil cinético del transporte en alguno de los cultivos primarios de los pacientes. Especialmente clarificadores han sido los resultados del estudio realizado en la células del paciente P-3, donde se ha caracterizado una cinética de transporte con Km similar a los valores control y una Vmax drásticamente reducida con respecto a la determinada en la media de controles (<25%), que podría correlacionarse con una disminución en la cantidad de proteína transportadora. En cualquier caso, la hemicigosidad de los alelos SLC6A8 ofrece la ventaja de que el estudio del transporte de Cr en las células de los pacientes CRT1, nos permite obtener conclusiones sobre el impacto de las mutaciones en la función proteica.

Complementariamente, la determinación de la actividad enzimática de GAMT realizada por el Instituto de Bioquímica Clínica (IBC) de Barcelona, y los estudios espectroscópicos de resonancia magnética en cerebro proporcionadas por los hospitales, permitieron sin duda orientar el diagnóstico.



## 5.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PACIENTES CDS Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS

La caracterización molecular de los pacientes con posibles defectos en los genes SLC6A8, GAMT y AGAT se realizó, siempre que fue posible, mediante secuenciación de la región codificante completa de los genes correspondientes, y posterior confirmación de la presencia del cambio/os identificados en ambas hebras de DNA genómico. De esta forma se ha corroborado el diagnóstico de CRT1 ó GAMT en todos los pacientes previamente seleccionados por tener transporte de creatina o actividad GAMT deficiente, e identificado **6** variantes alélicas en el gen SLC6A8, (**4** de ellas no descritas anteriormente) y **5** variantes en el gen GAMT (de las que **3** son nuevas). Durante el transcurso de este trabajo se han identificado por tanto un total de **9** pacientes y se ha realizado el estudio de portadores en **22** familiares. En el caso del gen AGAT, no se ha identificado ninguna variación nucleotídica susceptible de ser patogénica.

Para concluir que una variación nucleotídica es causante de patología, uno de los primeros pasos es la confirmación de la segregación de la misma en la familia. En el caso del gen GAMT, este estudio pudo completarse en dos de las tres familias confirmando con ello que las mutaciones identificadas se encontraban sobre alelos distintos. En el gen SLC6A8, la segregación ligada al cromosoma X sólo pudo demostrarse en el caso del P-3 pero no para el resto. Aunque tal como se ha descrito previamente, podría tratarse de mutaciones *de novo* heredadas por vía germinal (Battini, et al., 2007 ; deGrauw, et al., 2002; Anselm, et al., 2006), no podemos descartar, al menos para alguna de las familias en estudio, la existencia de un mosaicismo somático o germinal que pudiese dar cuenta de la segregación y que escapase al sistema de detección de mutaciones utilizado en este trabajo. De hecho, en un trabajo publicado en 2008 se caracterizó un mosaicismo somático de un 1% en la madre de 2 individuos afectados de deficiencia de CRT1, utilizando para el análisis la formación de heteroduplex con el sistema DHPLC (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography) (Betsalel, et al., 2008). Por ello, y considerando la especial relevancia que tiene la confirmación o no de la existencia de un mosaicismo en el contexto de un posible consejo genético a las familias, se pretende completar el estudio utilizando la técnica de piro-secuenciación que permite una mayor amplificación de DNA y la detección de DNA's mutados que se encuentren en baja proporción (Metzker, 2010).

Una vez conocidos los cambios nucleotídicos de cada paciente y comprobado su patrón de segregación, es necesario abordar el impacto funcional de las variantes alélicas

identificadas. Hay variaciones que por su naturaleza son previsiblemente patogénicas. Éste es el caso de todos los cambios que suponen la aparición de un codón de parada prematura, incluidos los cambios sin sentido, los cambios en la pauta de lectura (*frameshift*), o las alteraciones que afecta al correcto procesamiento del mRNA. Para el resto, fue preciso diferenciar entre variantes causantes de enfermedad y polimorfismos o SNP's (*Single Nucleotide Polymorphisms*) sabiendo que éstos están presentes en la población normal con una frecuencia igual o superior al 0,01% (Cotton and Sriver, 1998). Por ello, para todas las variantes identificadas por primera vez en este estudio y cuyo efecto previsible sería el cambio o la eliminación en fase de un aminoácido, se descartó su presencia en 300 alelos control del mismo origen étnico. Aunque sin duda es la sobreexpresión de los alelos mutantes la prueba irrefutable del efecto de los cambio sobre la funcionalidad de la proteína (Rosenberg, et al., 2007), el primer indicio de que un cambio aminoacídico es causante de enfermedad es que se produzca sobre algún residuo conservado de la proteína, es decir, en dominios esenciales para conservar su estructura y/o función que también suelen ser regiones conservadas en proteínas ortólogas. Sin embargo, obtener la estructura de las proteínas experimentalmente con métodos de resonancia magnética nuclear (RMN) y rayos X es un proceso caro y laborioso. Y aunque en la actualidad hay más de veintinueve mil estructuras de proteínas almacenadas en bases de datos, esta cantidad es cinco veces inferior a la de entradas de secuencias de proteínas en bases de datos. Para cubrir este importante vacío se han desarrollado técnicas bioinformáticas, que son capaces de producir modelos útiles de las estructuras de muchas proteínas, utilizando procedimientos de aprendizaje basados en la información de secuencias y estructuras ya conocidas y así predecir a partir de ellas la estructura de nuevas proteínas (<http://wwwa.urv.cat/centres/enologia/tematic/ensenyaments/biotecnologia/infobioturv/Cotec%20Informe%20Biotec%20Medicina.pdf>).

Entre ellos el programa PolyPhen utilizado en este trabajo predice el efecto de un cambio de aminoácido sobre la función y estructura de una proteína humana basándose en los conocimientos actuales de estructura 3D de la proteína correspondiente, interacciones, sitios activos, evolución y filogenia. El resto de variaciones se analizaron con la herramienta CLUSTAL W que estudia la conservación de los dominios y los aminoácidos afectados en proteínas parálogas u ortólogas.

En el caso de los pacientes CRT1 se han encontrado 6 variaciones de las cuales 3 son pequeñas deleciones de un aminoácido y 3 cambios de un aminoácido por otro. Los análisis *in silico* ha mostrado que, efectivamente todos los cambios, con excepción de **c.1210G>C (p.A404P)** en el P-4, afectan a residuos idénticos o muy conservados en todas las secuencias aminoacídicas estudiadas de la familia de transportadores dependientes de

Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> y en las proteínas ortólogas comparadas, incluso entre especies muy alejadas evolutivamente.

En el caso de las variaciones en el gen *GAMT* las dos mutaciones incluidas en el estudio; **c.59C>G (p.W20S)** y **c.407C>T (p.T136M)** fueron clasificadas como probablemente patogénicas, siendo especialmente relevante el efecto previsto para **p.T136M** que parece provocar un cambio de hidrofobicidad en el núcleo interno de la proteína.

Aunque los análisis *in silico* permiten realizar un estudio preliminar de las mutaciones o variantes de interés, para predecir la gravedad del fenotipo clínico y bioquímico en los pacientes es necesario conocer tanto la gravedad del efecto causado por las mutaciones sobre la función proteica, como los mecanismos a través de los cuales estas mutaciones causan la pérdida de dicha función.

Desde la información codificada en un gen hasta la traducción a una proteína efectora, existen procesos intermedios, también sujetos a regulación y por tanto susceptibles de cambios. Los defectos asociados a los sistemas de procesamiento y control de calidad del mRNA son los que tiene mayor relevancia en la práctica clínica (Bolognani and Perrone-Bizzozero, 2008).

Aquí, hemos utilizado los fibroblastos de los pacientes como modelo *ex vivo* para investigar las consecuencias de las mutaciones a nivel de mRNA. La drástica reducción de los transcritos *SLC6A8* y *GAMT* identificadas en todas las líneas celulares que portan alelos sin sentido, y el aparente rescate de los mismos cuando las células se incuban con emetina, son resultados consistentes con una activación del sistema de vigilancia NMD. De hecho, todos cumplen con la regla de presentar un codón de parada prematura (PTC) al menos a 50-55pb antes de un sitio de unión exón-exón formado tras el proceso de maduración (*splicing*) (Lejeune and Maquat, 2005; Wang, et al., 2002), y por ello la degradación por el sistema NMD evitaría la creación de proteínas truncadas (Maquat, 2004). Los pacientes P-7 y P-9 (*GAMT*) son ambos heterocigotos para una mutación PTC y una de cambio de aminoácido, por tanto, el efecto observado será el efecto contributivo de ambos alelos.

Dos son los cambios para los que se han detectado caídas significativas en los niveles de los transcritos correspondientes, pero que por motivos diferentes escapan a la regla del PTC. Uno es la mutación del P-8 *GAMT* **p.[Y49fs] + [Y49fs]** que generaría una parada prematura, a 36 pb de la unión exón-exón; y el otro es el cambio del **P-3** *SLC6A8* **c.1079\_1081delTCT** cuyo efecto previsible sería la delección del residuo Phe360.

En ambos casos, la identificación de posibles transcritos aberrantes se hizo mediante clonaje y secuenciación de los transcritos rescatados tras el tratamiento con emetina. Para el paciente P-8 **p.[Y49fs] + [Y49fs]** se detectaron junto al transcrito de tamaño normal, dos transcritos aberrantes que eliminaban uno el exón 2 y otro el exón 3, provocando las consiguientes paradas prematuras y desencadenando la activación del NMD. En este caso,

la plataforma bioinformática HSFinder predecía una alteración del punto de ramificación o *branch point* esencial para la formación del spliceosoma y también de los factores SC35 y SF2/ASF que podría ser responsable del patrón erróneo de procesamiento identificado experimentalmente.

En el caso del P-3, el transcrito mayoritariamente representado era el correspondiente al alelo de tamaño normal con la delección en fase del trinucleótido (**c.1079\_1081delTCT**). Por ello y para conocer si el aumento en la cantidad relativa de transcrito podría reflejar un aumento en la estabilidad o por el contrario ser el resultado de un aumento en la síntesis, se realizó un rescate simultáneo con emetina y actinomicina D, que bloqueaba la transcripción. En el estudio, además de los fibroblastos del P-3, se incluyeron los del P-1 en los que ya se había constatado un NMD y los del P-4 con perfil transcripcional de SLC6A8 similar a los controles. La conclusión de estos experimentos fue que el aumento identificado en P-3 tras el rescate con emetina no era el efecto de un aumento en la transcripción de SLC6A8, sino el reflejo de una estabilización del mismo. Se estima que la estabilidad del mRNA regula la expresión de un 5-10% de genes. La tasa de degradación de mRNA está regulada por la interacción de elementos en *cis* en los transcritos, proteínas de unión a RNA específicas de secuencia e incluso micro-RNA's (Bolognani and Perrone-Bizzozero, 2008). Una alteración causada por la variación nucleotídica en uno de estos elementos reguladores podría provocar un cambio en la susceptibilidad de sus mRNA's a ser degradados.

La caracterización de la proteína CRT1 mediante *Western Blot* no ha sido algo trivial puesto que en fibroblastos, como se había descrito en otras células (Speer, et al., 2004; Straumann, et al., 2006), eran numerosas las especies moleculares identificadas, y todas ellas divergían sustancialmente de la masa molecular predicha (72kDa). Varios son los autores que identificaron como especies CRT1 maduras, proteínas con tamaños comprendidos entre 55-58kDa (Speer, et al., 2004 ; Strauman et al, 2006). Junto a ellas, aparecían proteínas inmuno-reactivas con masas moleculares entre 75-91kDa ya descritas en otros miembros de la familia de transportadores de neurotransmisores. Teniendo en cuenta estas divergencias, la cuantificación de la banda de  $\cong$  55kDa confirmó para las células de los pacientes P-1 (**p.W154X**) y P-3 (**c.1079\_1081del TCT**) una bajada de los niveles de proteína CRT1 detectados, que se correlacionaba con la reducción encontrada de la abundancia relativa de sus transcritos, y unos valores de proteína CRT1 (**p.A404P**) reactiva en P-4, incluso superiores a la media de controles.

### **5.3 IMPACTO DE LOS DEFECTOS DE CREATINA CEREBRAL SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR**

Dado el papel esencial de la Cr en el metabolismo energético mitocondrial, sería esperable que una reducción o ausencia total de Cr en las células provocará un déficit energético con graves consecuencias para la célula. Situaciones de requerimiento energético a corto plazo implican un estrés extra para la cadena respiratoria que conlleva la generación celular de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Das, et al., 2000). Crecientes evidencias apoyan que el estrés oxidativo y la apoptosis son fenómenos estrechamente relacionados, que podrían ser relevantes para explicar los aspectos neuropatológicos en varias enfermedades metabólicas y neurodegenerativas (Beard and Braissant, 2010). A concentraciones normales, las ROS juegan un papel esencial en las funciones celulares y están involucradas en procesos de transducción de señales incluyendo las de proliferación celular. Sin embargo, una descompensación entre la generación de ROS y la capacidad de los antioxidantes para neutralizarlos puede resultar en una alteración del estado redox celular y provocar un estrés oxidativo (Circu and Aw, 2010).

En este trabajo hemos encontrado por primera vez una superproducción de ROS en dos líneas celulares de pacientes CRT1 (P-1 y P-3) y en dos de GAMT (P-7 y P-9). Los resultados mostraron que las líneas con mayores niveles de ROS tanto de deficiencia de CRT1 como de GAMT se correspondían con las que tienen los mayores niveles de apoptosis temprana y tardía medidos como niveles de anexina V positiva. Es decir, niveles altos de radicales libres podrían inducir apoptosis en líneas CDS, tal y como se ha descrito para otras enfermedades (Kim and Wong, 2009; Benhar, et al., 2002; Ma, 2010). Son numerosas las señales de estrés oxidativo que provocan activación de rutas de señalización mediadas por quinasas (Kumar, et al., 2003) que a su vez modulan la expresión génica, controlando entre otros procesos apoptosis, crecimiento celular o diferenciación. Dentro de éstas, la p38MAPK juega un papel fundamental en la respuesta celular a daño oxidativo o choque osmótico. En nuestros pacientes el estudio de activación de p38MAPK en fibroblastos reveló un patrón de activación diferente en las células CRT1 y GAMT. Así, mientras los fibroblastos de los pacientes CRT1 con mayores niveles de ROS y apoptosis también presentaban razones de p38-fosforilada/p38-total, al menos 10 veces superiores a las detectadas en individuos control, los fibroblastos CRT1 con menos ROS no presentaban activaciones significativas de p38. No se detectó activación estadísticamente significativa de esta ruta en las células de pacientes GAMT con niveles aumentados de ROS y apoptosis.

Se ha descrito que una pérdida del control del estado redox en la célula puede afectar al normal funcionamiento del ciclo celular, desembocando en una proliferación aberrante (Sarsour, et al., 2009). La progresión del ciclo celular está regulada por "puntos de control" que protegen la integridad del genoma (Hartwell and Weinert, 1989). Si las células que se están dividiendo resultan dañadas, el ciclo celular puede pausarse para intentar reparar el daño si es posible, y posteriormente continuar el ciclo. Si el daño es demasiado grande las células pueden ser arrestadas en algún punto del ciclo o iniciar procesos apoptóticos o de senescencia, ambos inducidos por p53 (Shackelford, et al., 2000). En este trabajo, se ha detectado un porcentaje significativo de células en sub-G0/G1 en las líneas celulares CRT1 (P-1 y P-3) y GAMT (P-7 y P-9). Estas células son consideradas como células con un contenido menor de DNA o que han sufrido daño en el mismo y por tanto, no serían viables e indicarían la existencia de procesos apoptóticos. También se detectó una inhibición significativa en la transición G2/M a G0/G1 en la mayoría de las líneas CDS que indicaba la existencia de un posible punto de control regulado a este nivel probablemente por la acción de p53 (Thornton and Rincon, 2009), que a su vez puede ser activada a través numerosas rutas de señalización, entre ellas la ruta de p38MAPK (Bulavin, et al., 1999) o directamente por las ROS (Meplan, et al., 2000 ; Benhar, et al., 2001). La implicación de p53 en la respuesta de las células CDS al estrés metabólico nuevamente parece compleja y probablemente reflejo de rutas diferentes de señalización. Así, la activación de p53 observada en los fibroblastos de P-7 (GAMT) con niveles elevados de ROS pero sin una activación significativa de la ruta de p38MAPK parecería reflejar una activación directa de p53 por las ROS, aunque algo similar no fue detectable en el P-9 (GAMT) a pesar de su alto contenido en ROS. Por el contrario en el caso de los pacientes P-1 y P-3 (CRT1) sí parece existir una correlación directa entre las alteraciones del ciclo celular, la activación de p53, y su activación por p38MAPK.

La división celular es un proceso dependiente de energía, y para completarlo con éxito las células deben tener suficiente aporte de nutrientes esenciales para abordar tanto la producción de ATP como la síntesis macromolecular (Jones, et al., 2005). En este contexto, primeramente se hipotetizó que el patrón de ciclo celular alterado y la activación de rutas señalizadoras activadas por estrés oxidativo en nuestras líneas celulares podrían estar reflejando una depleción energética como resultado de un contenido disminuido de Cr. Sin embargo, tras cuantificar los niveles de Cr endógena, se observó que sólo las líneas de los

pacientes CRT1 mostraron niveles disminuidos de Cr, siendo normales en las líneas de los pacientes GAMT. Estos datos que sitúan a los fibroblastos entre las células para las que el transporte de Cr es primordial para su homeostasis, y también corroboran el controvertido papel del metabolismo de la Cr en la respuesta a estrés celular. El daño oxidativo encontrado en los fibroblastos de los pacientes GAMT (P-7 y P-9) no puede por tanto ser explicado por una disminución de las reservas de fosfato de alta energía, ya que los niveles intracelulares de Cr son similares a los controles.

Estudios previos en animales mostraron una inhibición de la actividad  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasa}$  y una disminución de la capacidad antioxidante del cerebro causada por acumulación de GAA en el striatum de rata, probablemente mediada por la formación de óxido nítrico (Zugno, et al., 2004), (Zugno, et al., 2008), por lo que se propone la implicación del daño oxidativo mediado por GAA como una razón relevante para explicar los mecanismos de la patología cerebral en pacientes afectados de deficiencia de GAMT.

Otro aspecto que sin duda merece la pena ser explorado, es el relativo al efecto de los alelos GAMT (**p.W20S** o **p.T136M**) sobre el correcto plegamiento de las proteínas traducidas. En estos casos, si como parece altamente probable para **p.T136M**, la proteína traducida se plegara incorrectamente, podría provocar una sobresaturación de los sistemas de control de calidad de proteínas y la consiguiente alteración de gran número de funciones celulares incluido el balance oxidativo (Gregersen and Bross, 2010 ; Schmidt, et al., 2010).

Finalmente, muy recientemente se ha propuesto para GAMT un nuevo papel como una diana inducible por p53, quien de esta forma se implicaría directamente en la respuesta adaptativa al daño genotóxico y al estrés por falta de nutrientes (Ide, et al., 2009 ; Vousden, 2010). Esta compleja interrelación podría en un futuro ayudar a desentrañar las diferencias encontradas entre los pacientes GAMT y CRT1, y las líneas celulares de CDS podrían usarse como modelo para continuar explorando las funciones metabólicas de p53.

En su conjunto todos estos datos sugieren que la respuesta celular apoptótica al daño genotóxico en pacientes CRT1 y GAMT podría utilizar rutas de señalización diferentes en cada defecto.



## **5.4 PERFIL TRANSCRIPCIONAL**

En este estudio hemos utilizado los fibroblastos de los pacientes como modelo de estudio para explorar el efecto de una condición genética determinada sobre la expresión de los genes relacionados. Los resultados de hecho muestran diferencias transcripcionales entre los pacientes CRT1 y GAMT.

Todas las líneas celulares CRT1, excepto el paciente P-3, muestran niveles de expresión de GAMT cercanos a la normalidad. Aún cuando los datos de expresión de SLC6A8 y GAMT no se correlacionan con los niveles de Cr endógenos determinados, es especialmente reseñable que en los fibroblastos del paciente P-4 con niveles de Cr intracelulares superiores a los medidos en las restantes líneas CRT1 también se detectan los niveles más altos de transcritos SLC6A8 y GAMT. Podemos hipotetizar que quizás un método más sensible de cuantificación de Cr permitiría detectar pequeñas diferencias en los niveles de Cr que se correlacionasen mejor con la expresión de los genes del metabolismo de la Cr.

Todas las células de los pacientes GAMT presentan un perfil transcripcional similar, en el que además de la disminución de la cantidad relativa de GAMT, se observa un aumento de casi dos veces en la expresión de gen SLC6A8. Es decir, el mantenimiento de la homeostasis de Cr en los fibroblastos de los pacientes GAMT sería el resultado de un incremento en el transporte de la misma desde el espacio extracelular, que compensaría la posible depleción energética asociada a la síntesis deficiente. Aunque, se ha reportado una cascada de señalización que incluiría a las isoformas SGK1 y SGK3 de quinasas inducibles por glucocorticoides (Shojaiefard, et al., 2005), y a la quinasa m-TOR (Shojaiefard, et al., 2006) como factores que aumentarían el tráfico del transportador CRT1 a la membrana plasmática (Strutz-Seeböhm, et al., 2007) queda por explorar si p53, ya implicado en control metabólico a través de su comunicación con AMPK y mTOR, podría controlar bajo situaciones de estrés metabólico la expresión de SLC6A8, en forma similar a la descrita para GAMT (Zhu and Prives, 2009). También está descrito en rata una regulación negativa de la expresión del transportador de Cr cuando existe un suplemento crónico de Cr en el animal (Guerrero-Ontiveros and Wallimann, 1998).

La situación en cerebro, diana principal de afectación en los pacientes CDS, sería aún más compleja. En este caso, y basándose en los numerosos estudios de Braissant y col (Braissant, et al., 2010) sobre la compartimentalización de las proteínas implicadas en el metabolismo de creatina, son los oligodendrocitos los “actores” principales en términos no sólo de síntesis de creatina, tráfico y transporte (Braissant, et al., 2008) y sería por tanto fundamental analizar aquí el efecto de una perturbación genética en los genes SLC6A8 y GAMT sobre el resto de los genes implicados en el metabolismo de creatina.



## **5.5 CREATINA COMO POSIBLE TERAPIA**

La Cr es ampliamente conocida por sus beneficios ergogénicos (Wallimann, 2007). Sin embargo, en los últimos años se le están atribuyendo interesantes propiedades en el tratamiento de enfermedades neurológicas con compromiso energético y elevada producción de ROS con un claro efecto antioxidante (Kingsley, et al., 2009), y también como neuroprotector aumentando la supervivencia neuronal en modelos animales de la enfermedad de Corea de Huntington (Andreassen, et al., 2001; Ferrante, et al., 2000). Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos en Corea de Huntington y Parkinson con resultados prometedores utilizando Cr como terapia (Dedeoglu, et al., 2003; Hersch, et al., 2006); (Beard and Braissant, 2010).

La suplementación con Cr ejercería estas propiedades antioxidantes y anti-apoptóticas bien anulando la acción de las ROS o bien reduciendo su producción en la mitocondria (Sestili, et al., 2006). Estos efectos tendrían lugar por la acción de la Mi-CK que reduce la generación de ROS a través del control del consumo de oxígeno celular en la cadena respiratoria por el reciclaje del ADP (Arakaki, et al., 1999 ; Kay, et al., 2000) y previene o retrasa la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial que es un paso inicial en los procesos apoptóticos (Dolder, et al., 2003). Se ha demostrado cómo la inhibición de la actividad CK provoca un aumento significativo de ROS (Glaser, et al., 2010). Además se ha descrito que la Cr es capaz de proteger células cultivadas de choques hiperosmóticos, incrementado el transporte de Cr intracelular, para que ésta actúe como osmolito compensatorio (Alfieri, et al., 2006).

En el caso de las CDS las células de los pacientes sufrirían una deficiencia energética por la deficiencia de Cr, y por tanto la administración de Cr intentaría suplir esta deficiencia y sus consecuencias. Así la incubación con altas concentraciones de Cr de dos líneas CRT1 (P-1, P-3), con los niveles más elevados de ROS y de apoptosis y disminuidos de Cr, provocó un aumento en los niveles endógenos de Cr en ambas líneas aunque sin alcanzar los niveles control, lo que confirma la entrada de la Cr en las células probablemente mediante transporte pasivo. También tuvo como consecuencia un avance y progresión de las fases del ciclo celular, una disminución de la fase sub-G0/G1 y de los niveles de ROS al menos en una línea. Estos resultados corroboran una vez más, la implicación de la deficiencia de Cr en la capacidad de las células para completar el ciclo celular, y apoyan un posible papel como antioxidante asociado a su función como reserva energética. Por tanto, sería de gran interés la realización de futuros estudios sobre los posibles efectos beneficiosos de compuestos antioxidantes o intentar aumentar las defensas endógenas

como glutathione, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa para intentar paliar los efectos secundarios del estrés oxidativo en los pacientes (Bouayed and Bohn., 2010).

Aunque en estos años ha tenido lugar una gran mejora en los métodos de diagnóstico para el defecto en CRT1, la ausencia de un tratamiento eficaz tiene como consecuencia que los pacientes sigan presentando graves secuelas neurológicas. Desgraciadamente, la suplementación de Cr en la dieta sólo aumenta los niveles de Cr cerebral aproximadamente una tercera parte de lo que aumentan en músculo. La razón de esta discrepancia parece estar en la barrera hematoencefálica, cuya función protectora frente a toxinas, patógenos, etc. limita la entrada de moléculas como la Cr (Braissant, et al., 2001). De momento las terapias basadas en la utilización de éster etílico de Cr y otros compuestos lipofílicos derivados de la Cr para facilitar su entrada a través de la barrera hematoencefálica no han conseguido los efectos deseados (Fons, et al., 2009 ; Lunardi, et al., 2006). Sin embargo, el aumento en los niveles de Cr endógenos en las dos líneas CRT1 (P-1 y P-3) al ser incubadas en presencia de Cr a altas concentraciones confirma la entrada de Cr, probablemente por difusión pasiva. Estos resultados ratifican la importancia de basar las futuras terapias en conseguir que la Cr penetre la barrera hematoencefálica y hacerla llegar a las células del sistema nervioso.

## **5.6 INTEGRACIÓN DE LAS VARIACIONES EN EL DNA, EXPRESIÓN GÉNICA Y FENOTIPO CLÍNICO. POSIBLE RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO**

La relación entre el genotipo de un organismo y su fenotipo no es tan sencilla como la simple relación de uno a uno (Dipple and McCabe, 2000), sino el resultado en muchos casos de una red compleja de interacciones entre los productos génicos de multitud de genes diferentes (Lehner, 2007), incluidos los relativos a la expresión de los genes responsables de factores de procesamiento y/o vigilancia del mRNA (Nissim-Rafinia, et al., 2004; Nissim-Rafinia and Kerem, 2005; Tazi, et al., 2005) o los implicados en el control de calidad de proteínas (Khajavi, et al., 2006). La complejidad de esta relación queda bien ilustrada en las enfermedades metabólicas hereditarias, que aún siendo el resultado de mutaciones en un único gen constituyen modelos valiosos para analizar la compleja interacción de los genes con el ambiente y más concretamente de los genes con los nutrientes (Lanpher, et al., 2006; Roux-Rouquie, 2000 ; Scriver and Waters, 1999). Por tanto, la dificultad de predecir el fenotipo a partir del genotipo es resultado de una suma de posibles efectos de un genotipo determinado expuesto a diversos entornos. Esta correlación puede resultar aún más complicada, si como ocurre en el caso del síndrome de deficiencia

de creatina cerebral, no hay criterios estandarizados que ayuden a establecer el grado de severidad de la presentación clínica.

Aún así, el estudio recogido en esta memoria permite establecer una clara asociación entre determinados genotipos CRT1 y GAMT con la presencia o ausencia de estrés metabólico en los fibroblastos de los pacientes y la gravedad de la afectación neurológica (Tabla 23).

Esta asociación es aún más clara en determinados pacientes CRT1. Así, el paciente P-4, portador de la única variación (**p.A204P**) en el gen SLC6A8, que no afecta a un residuo conservado de la proteína y cuyas células no muestran evidencia alguna de estrés metabólico, sólo ha manifestado un retraso psicomotor leve, marcha torpe y retraso en el lenguaje (Alcaide, et al., 2010). Los pacientes P-1 y P-3, para los que en este trabajo se reporta una reducción en la abundancia relativa de transcritos SLC6A8 y un perfil de estrés metabólico, se pueden encuadrar entre las formas más graves de la patología por mostrar entre otros síntomas epilepsia, retraso mental profundo, comportamiento autista y retraso o ausencia de lenguaje. Más difícil es la interpretación de los resultados obtenidos en las células de los pacientes CRT1 P-2, P-5 y P-6, que a pesar de que muestran manifestaciones moderadas o ausentes de estrés metabólico, presentan niveles drásticamente reducidos de Cr endógenos y formas graves de la presentación clínica.

Los tres pacientes GAMT se encuadran en un fenotipo grave de la enfermedad aún cuando sólo hay evidencia de estrés metabólico en dos de ellos.

Con todo, podemos especular que la sobreproducción de ROS identificada en varios de nuestros pacientes podría exacerbar o contribuir al grave daño neurológico de los mismos y apoyaría la potencialidad de buscar biomarcadores de estrés oxidativo en sangre periférica como ya se ha descrito en otras patologías (Atkuri, et al., 2009) y de reducir la producción de ROS y apoptosis mediada por estrés oxidativo como estrategia para el tratamiento de los pacientes con síndrome de creatina cerebral

La caracterización última del impacto de los alelos naturales identificados en los pacientes sobre el metabolismo energético requerirá primero la elección de un buen modelo celular del sistema nervioso que refleje por un lado la compartimentalización de la ruta metabólica y por otro la patología. Aunque una posible estrategia sería la interferencia de los genes SLC6A8 y GAMT con siRNA (O'Reilly, et al., 2007 ; Di Benedetto, et al., 2008), el reciente descubrimiento de la reprogramación de células somáticas de los propios pacientes para convertirlas en células pluripotentes ha abierto un campo de investigación que permitirá una mejor comprensión de la patogenia y el estudio de posibles agentes terapéuticos. (Takahashi, et al., 2007).



## 6. CONCLUSIONES





1. Con el algoritmo diagnóstico utilizado en este estudio y que incluye: a) la cuantificación de los niveles de GAA y relación Cr/Crn en orina de pacientes con sospecha de EMH o con retraso mental, y estudio por  $^1\text{H}$ -MRS cerebral para la preselección de pacientes; b) confirmación del defecto mediante estudio enzimático de GAMT o de transporte de creatina en fibroblastos, y c) análisis mutacional del gen afectado, se ha confirmado un síndrome de creatina cerebral en 9 pacientes de los 17 preseleccionados. Seis lo son por defecto en el transporte de creatina (gen SLC6A8) y tres por defecto en la ruta de síntesis, más concretamente en el gen GAMT. No se ha identificado ningún paciente con defecto en el gen AGAT.
2. Para la confirmación bioquímica de la deficiencia en el transportador de creatina, se ha diseñado un ensayo radiactivo en fibroblastos de piel cultivados de los pacientes que nos ha permitido trabajar a velocidades iniciales y, dadas la condición de hemigiosidad de los alelos SLC6A8, analizar directamente el impacto de las mutaciones sobre la cinética de transporte.
3. Se han identificado un total de once variaciones nucleotídicas, presumiblemente patogénicas, seis en el gen SLC6A8 y cinco en GAMT, de ellas siete son nuevas: cuatro en el gen SLC6A8 (una mutación sin sentido, dos variaciones de cambio de aminoácido y una delección de un aminoácido) y tres en el gen GAMT (una de cambio de pauta de lectura, una mutación sin sentido y otra de cambio de aminoácido).
4. Se han detectado reducciones en la cantidad relativa de transcritos del gen afectado en los fibroblastos de pacientes portadores de mutaciones PTC para los que se ha comprobado la existencia de procesos de degradación por NMD. También se ha constatado que la reducción en la abundancia relativa del transcrito SLC6A8 **c.1079\_1081delTCT** parece reflejo de una disminución en la estabilidad del mismo.
5. En este trabajo, se ha encontrado por primera vez evidencia de superproducción de ROS, apoptosis, afectación de rutas de señalización activadas por estrés y proliferación aberrante en células de pacientes CDS que mostraban reducción significativa de la cantidad relativa de transcritos de su gen afectado.
6. El daño oxidativo en los fibroblastos de pacientes CDS no puede explicarse sólo por una depleción energética puesto que las células de los pacientes GAMT no la presentan. Este hecho junto con las diferencias observadas en el perfil de activación de las

proteínas p38MAPK y p53 apuntan hacia diferentes rutas de generación de estrés metabólico entre los defectos CRT1 y GAMT.

7. La incubación con altas cantidades de Cr en fibroblastos de pacientes CRT1 parece asociarse a una disminución en el número de células apoptóticas medidas como población sub-G0/G1 y a una progresión hacia las distintas fases del ciclo celular, poniéndose con ello de manifiesto el papel esencial de la creatina como reserva energética.
8. La existencia de una compleja red de interacciones genéticas hace que sea difícil establecer una correlación genotipo-fenotipo (como en la mayoría de las enfermedades metabólicas hereditarias). Sin embargo, se ha observado una clara relación entre ciertos genotipos, mayoritariamente portadores de alelos PTC, con aumento de marcadores de estrés metabólico, y presentación más grave de la enfermedad. Por otro lado también se ha observado una asociación de la variación **p.A404P** (SLC6A8) con ausencia de estrés oxidativo, altos niveles de transcritos y proteína y fenotipo clínico más leve.
9. La alta dependencia por parte de los fibroblastos del transporte de Cr para la homeostasis de la misma, los convierte en un buen modelo celular en el que explorar las consecuencias del defecto en el gen SLC6A8. Sin embargo, el estudio en fibroblastos de pacientes GAMT ha puesto de manifiesto la necesidad de explorar nuevas interconexiones distintas de las derivadas directamente de la deficiencia energética entre el metabolismo de la creatina y la respuesta celular a estrés metabólico.
10. La aproximación holística a la patología, integrando el conocimiento clínico, bioquímico, genético, el perfil transcripcional y la implicación del defecto en otras funciones celulares contribuirá no sólo a la identificación de nuevos parámetros diagnósticos sino incluso al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas .



## 7. BIBLIOGRAFÍA





## **7. BIBLIOGRAFIA**

- Alcaide P, Rodriguez-Pombo P, Ruiz-Sala P, Ferrer I, Castro P, Ruiz Martin Y, Merinero B, Ugarte M. 2010. A new case of creatine transporter deficiency associated with mild clinical phenotype and a novel mutation in the SLC6A8 gene. *Dev Med Child Neurol* 52(2):215-7.
- Alfieri RR, Bonelli MA, Cavazzoni A, Brigotti M, Fumarola C, Sestili P, Mozzoni P, De Palma G, Mutti A, Carnicelli D and others. 2006. Creatine as a compatible osmolyte in muscle cells exposed to hypertonic stress. *J Physiol* 576(Pt 2):391-401.
- Almeida LS, Verhoeven NM, Roos B, Valongo C, Cardoso ML, Vilarinho L, Salomons GS, Jakobs C. 2004. Creatine and guanidinoacetate: diagnostic markers for inborn errors in creatine biosynthesis and transport. *Mol Genet Metab* 82(3):214-9.
- Almeida LS, Rosenberg H. 2006. Are cerebral creatine deficiency syndromes on the radar screen?. *Future Neurology* 1 (5):637-649.
- Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C, Schoffemeer AN. 2006. Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* 60(2):118-23.
- Almeida LS, Vilarinho L, Darmin PS, Rosenberg EH, Martinez-Munoz C, Jakobs C, Salomons GS. 2007. A prevalent pathogenic GAMT mutation (c.59G>C) in Portugal. *Mol Genet Metab* 91(1):1-6.
- Almeida LS, Sarmiento-Ribeiro AB, Januario C, Rego AC, Oliveira CR. 2008. Evidence of apoptosis and mitochondrial abnormalities in peripheral blood cells of Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 374(4):599-603.
- Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Jenkins BG, Ferrante KL, Thomas M, Friedlich A, Browne SE, Schilling G, Borchelt DR and others. 2001. Creatine increase survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8(3):479-91.
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR. 2008. Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76(4):329-43.
- Anselm IA, Alkuraya FS, Salomons GS, Jakobs C, Fulton AB, Mazumdar M, Rivkin M, Frye R, Poussaint TY, Marsden D. 2006. X-linked creatine transporter defect: a report on two unrelated boys with a severe clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis* 29(1):214-9.
- Anselm IA, Coulter DL, Darras BT. 2008. Cardiac manifestations in a child with a novel mutation in creatine transporter gene SLC6A8. *Neurology* 70(18):1642-4.
- Arakaki N, Kajihara T, Arakaki R, Ohnishi T, Kazi JA, Nakashima H, Daikuhara Y. 1999. Involvement of oxidative stress in tumor cytotoxic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Biol Chem* 274(19):13541-6.
- Arias A, Ormazabal A, Moreno J, Gonzalez B, Vilaseca MA, Garcia-Villoria J, Pampols T, Briones P, Artuch R, Ribes A. 2006. Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study. *J Neurosci Methods* 156(1-2):305-9.

- Arias-Dimas A, Vilaseca MA, Artuch R, Ribes A, Campistol J. 2006. [Diagnosis and treatment of brain creatine deficiency syndromes]. *Rev Neurol* 43(5):302-8.
- Arias A, Corbella M, Fons C, Sempere A, Garcia-Villoria J, Ormazabal A, Poo P, Pineda M, Vilaseca MA, Campistol J and others. 2007. Creatine transporter deficiency: prevalence among patients with mental retardation and pitfalls in metabolite screening. *Clin Biochem* 40(16-17):1328-31.
- Atkuri KR, Cowan TM, Kwan T, Ng A, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Enns GM. 2009. Inherited disorders affecting mitochondrial function are associated with glutathione deficiency and hypocitrullinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(10):3941-5.
- Bai RK, Wierenga KJ, Dimmock DP, Tang LY, Wong LJC. Creatine deficiency due to a novel nonsense mutation in the arginine: glycine amidinotransferase gene. 2008. American Society of Human Genetics, Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 640T (abstract).
- Baralle D, Lucassen A, Buratti E. 2009. Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice. *EMBO Rep* 10(8):810-6.
- Battini R, Leuzzi V, Carducci C, Tosetti M, Bianchi MC, Item CB, Stockler-Ipsiroglu S, Cioni G. 2002. Creatine depletion in a new case with AGAT deficiency: clinical and genetic study in a large pedigree. *Mol Genet Metab* 77(4):326-31.
- Battini R, Alessandri MG, Leuzzi V, Moro F, Tosetti M, Bianchi MC, Cioni G. 2006. Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency in a newborn: early treatment can prevent phenotypic expression of the disease. *J Pediatr* 148(6):828-30.
- Battini R, Chilosi A, Mei D, Casarano M, Alessandri MG, Leuzzi V, Ferretti G, Tosetti M, Bianchi MC, Cioni G. 2007. Mental retardation and verbal dyspraxia in a new patient with de novo creatine transporter (SLC6A8) mutation. *Am J Med Genet A* 143A(15):1771-4.
- Bayou N, M'Rad R, Belhaj A, Daoud H, Zemni R, Briault S, Helayem MB, Ben Jemaa L, Chaabouni H. 2008. The creatine transporter gene paralogous at 16p11.2 is expressed in human brain. *Comp Funct Genomics*:609684.
- Beard E, Braissant O. 2010. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem*. 115, 297–313.
- Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. 2001. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol Cell Biol* 21(20):6913-26.
- Benhar M, Engelberg D, Levitzki A. 2002. ROS, stress-activated kinases and stress signaling in cancer. *EMBO Rep* 3(5):420-5.
- Betsalel OT, van de Kamp JM, Martinez-Munoz C, Rosenberg EH, de Brouwer AP, Pouwels PJ, van der Knaap MS, Mancini GM, Jakobs C, Hamel BC and others. 2008. Detection of low-level somatic and germline mosaicism by denaturing high-performance liquid chromatography in a EURO-MRX family with SLC6A8 deficiency. *Neurogenetics* 9(3):183-90.

- Betsalel OT, Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, Schwartz CE, Valayannopoulos V, Abdul-Rahman O, Poplawski N, Vilarinho L, Wolf P and others. 2010. Characterization of novel SLC6A8 variants with the use of splice-site analysis tools and implementation of a newly developed LOVD database. *Eur J Hum Genet*.
- Bodamer OA, Bloesch SM, Gregg AR, Stockler-Ipsiroglu S, O'Brien WE. 2001. Analysis of guanidinoacetate and creatine by isotope dilution electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 308(1-2):173-8.
- Bodamer OA, Sahoo T, Beaudet AL, O'Brien WE, Bottiglieri T, Stockler-Ipsiroglu S, Wagner C, Scaglia F. 2005. Creatine metabolism in combined methylmalonic aciduria and homocystinuria. *Ann Neurol* 57(4):557-60.
- Bolognani F, Perrone-Bizzozero NI. 2008. RNA-protein interactions and control of mRNA stability in neurons. *J Neurosci Res* 86(3):481-9.
- Bouayed J, Bohn T. 2010. Exogenous antioxidants - Double-edged swords in cellular redox state: Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev* 3(4):228-237.
- Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C. 2001. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 86(1-2):193-201.
- Braissant O, Henry H. 2008. AGAT, GAMT and SLC6A8 distribution in the central nervous system, in relation to creatine deficiency syndromes: A review. *J Inherit Metab Dis*.
- Braissant O, Cagnon L, Monnet-Tschudi F, Speer O, Wallimann T, Honegger P, Henry H. 2008. Ammonium alters creatine transport and synthesis in a 3D culture of developing brain cells, resulting in secondary cerebral creatine deficiency. *Eur J Neurosci* 27(7):1673-85.
- Braissant O, Beard E, Torrent C, Henry H. 2010. Dissociation of AGAT, GAMT and SLC6A8 in CNS: Relevance to creatine deficiency syndromes. *Neurobiology of Disease* 37(2):423-433.
- Brichta L, Garbes L, Jedrzejowska M, Grellscheid SN, Holker I, Zimmermann K, Wirth B. 2008. Nonsense-mediated messenger RNA decay of survival motor neuron 1 causes spinal muscular atrophy. *Hum Genet* 123(2):141-53.
- Brosnan ME, Edison EE, da Silva R, Brosnan JT. 2007. New insights into creatine function and synthesis. *Adv Enzyme Regul* 47:252-60.
- Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E, Fornace AJ, Jr. 1999. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J* 18(23):6845-54.
- Buschmann T, Potapova O, Bar-Shira A, Ivanov VN, Fuchs SY, Henderson S, Fried VA, Minamoto T, Alarcon-Vargas D, Pincus MR and others. 2001. Jun NH2-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol Cell Biol* 21(8):2743-54.

- Ceraline J, Deplanque G, Duclos B, Limacher JM, Vincent F, Goldblum S, Bergerat JP. 1997. [Relationships between p53 induction, cell cycle arrest and survival of normal human fibroblasts following DNA damage]. *Bull Cancer* 84(11):1007-16.
- Circu ML, Aw TY. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48(6):749-62.
- Cooper DN, Stenson PD, Chuzhanova NA. 2006. The Human Gene Mutation Database (HGMD) and its exploitation in the study of mutational mechanisms. *Curr Protoc Bioinformatics* Chapter 1:Unit 1 13.
- Cotton RGH, Scriver CR. 1998. Proof of *disease causing* mutation. *Hum. Mutat.* 12:1-3.
- Cupello A, Balestrino M, Gatta E, Pellistri F, Siano S, Robello M. 2008. Activation of cerebellar granule cells GABA(A) receptors by guanidinoacetate. *Neuroscience* 152(1):65-9.
- Chae YJ, Chung CE, Kim BJ, Lee MH, Lee H. 1998. The gene encoding guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) maps to human chromosome 19 at band p13.3 and to mouse chromosome 10. *Genomics* 49(1):162-4.
- Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824):37-40.
- Chatterjee S, Kundu S, Sengupta S, Bhattacharyya A. 2009. Divergence to apoptosis from ROS induced cell cycle arrest: effect of cadmium. *Mutat Res* 663(1-2):22-31.
- Chilosi A, Leuzzi V, Battini R, Tosetti M, Ferretti G, Comparini A, Casarano M, Moretti E, Alessandri MG, Bianchi MC and others. 2008. Treatment with L-arginine improves neuropsychological disorders in a child with creatine transporter defect. *Neurocase* 14(2):151-61.
- Daly MM, Seifter S. 1980. Uptake of creatine by cultured cells. *Arch Biochem Biophys* 203(1):317-24.
- Das AM, Ullrich K, Isbrandt D. 2000. Upregulation of respiratory chain enzymes in guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 23(4):375-7.
- Dedeoglu A, Kubilus JK, Yang L, Ferrante KL, Hersch SM, Beal MF, Ferrante RJ. 2003. Creatine therapy provides neuroprotection after onset of clinical symptoms in Huntington's disease transgenic mice. *J Neurochem* 85(6):1359-67.
- deGrauw TJ, Salomons GS, Cecil KM, Chuck G, Newmeyer A, Schapiro MB, Jakobs C. 2002. Congenital creatine transporter deficiency. *Neuropediatrics* 33(5):232-8.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. 2009. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37(9):e67.
- Dezortova M, Jiru F, Petrasek J, Malinova V, Zeman J, Jirsa M, Hajek M. 2008. <sup>1</sup>H MR spectroscopy as a diagnostic tool for cerebral creatine deficiency. *Magma* 21(5):327-32.
- Dhar SU, Scaglia F, Li FY, Smith L, Barshop BA, Eng CM, Haas RH, Hunter JV, Lotze T, Maranda B and others. 2009. Expanded clinical and molecular spectrum of

- guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency. *Mol Genet Metab* 96(1):38-43.
- Di Benedetto R, Denti MA, Salvati S, Sanchez M, Attorri L, David G, Di Biase A. 2008. RNAi-mediated silencing of ABCD3 gene expression in rat C6 glial cells: a model system to study PMP70 function. *Neurochem Int* 52(6):1106-13.
- Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 8(21):2540-51.
- Dipple KM, McCabe ER. 2000. Phenotypes of patients with "simple" Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet* 66(6):1729-35.
- Dodd JR, Christie DL. 2001. Cysteine 144 in the third transmembrane domain of the creatine transporter is located close to a substrate-binding site. *J Biol Chem* 276(50):46983-8.
- Dodd JR, Christie DL. 2007. Selective amino acid substitutions convert the creatine transporter to a gamma-aminobutyric acid transporter. *J Biol Chem* 282(21):15528-33.
- Dolder M, Walzel B, Speer O, Schlattner U, Wallimann T. 2003. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J Biol Chem* 278(20):17760-6.
- Drane P, Bravard A, Bouvard V, May E. 2001. Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 20(4):430-9.
- Edvardson S, Korman SH, Livne A, Shaag A, Saada A, Nalbandian R, Allouche-Arnon H, Gomori JM, Katz-Brull R. 2010. L-arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: Clinical presentation and response to treatment in two patients with a novel mutation. *Mol Genet Metab* 101(2-3):228-32.
- Eichler EE, Lu F, Shen Y, Antonacci R, Jurecic V, Doggett NA, Moyzis RK, Baldini A, Gibbs RA, Nelson DL. 1996. Duplication of a gene-rich cluster between 16p11.1 and Xq28: a novel pericentromeric-directed mechanism for paralogous genome evolution. *Hum Mol Genet* 5(7):899-912.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, Kaddurah-Daouk R, Hersch SM, Beal MF. 2000. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 20(12):4389-97.
- Fons C, Sempere A, Arias A, Lopez-Sala A, Poo P, Pineda M, Mas A, Vilaseca MA, Salomons GS, Ribes A and others. 2008. Arginine supplementation in four patients with X-linked creatine transporter defect. *J Inherit Metab Dis* 31(6):724-8.
- Fons C, Arias A, Sempere A, Poo P, Pineda M, Mas A, Lopez-Sala A, Garcia-Villoria J, Vilaseca MA, Ozaez L and others. 2009. Response to creatine analogs in fibroblasts and patients with creatine transporter deficiency. *Mol Genet Metab* 99(3):296-9.
- Glaser V, Leipnitz G, Stralioetto MR, Oliveira J, Dos Santos VV, Wannmacher CM, de Bem AF, Rocha JB, Farina M, Latini A. 2010. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. *Neurotoxicology*.

- Gregersen N, Bross P. 2010 Protein misfolding and cellular stress: an overview. *Methods Mol Biol* 648:3-23.
- Gross MD, Eggen MA, Simon AM, Van Pilsum JF. 1986. The purification and characterization of human kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. *Arch Biochem Biophys* 251(2):747-55.
- Guerrero-Ontiveros ML, Wallimann T. 1998. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 184(1-2):427-37.
- Hartwell LH, Weinert TA. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246(4930):629-34.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116(Pt 20):4077-85.
- Hersch SM, Gevorkian S, Marder K, Moskowitz C, Feigin A, Cox M, Como P, Zimmerman C, Lin M, Zhang L and others. 2006. Creatine in Huntington disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH<sup>2</sup>dG. *Neurology* 66(2):250-2.
- Hochachka PW. 2003. Intracellular convection, homeostasis and metabolic regulation. *J Exp Biol* 206(Pt 12):2001-9.
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. 2004. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36(8):801-8.
- Honig LS, Rosenberg RN. 2000. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 108(4):317-30.
- Ide T, Brown-Endres L, Chu K, Ongusaha PP, Ohtsuka T, El-Deiry WS, Aaronson SA, Lee SW. 2009. GAMT, a p53-Inducible Modulator of Apoptosis, Is Critical for the Adaptive Response to Nutrient Stress. *Molecular Cell* 36(3):379-392.
- Ilas J, Muhl A, Stockler-Ipsiroglu S. 2000. Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: non-invasive enzymatic diagnosis of a newly recognized inborn error of metabolism. *Clin Chim Acta* 290(2):179-88.
- Im YS, Chiang PK, Cantoni GL. 1979. Guanidoacetate methyltransferase. Purification and molecular properties. *J Biol Chem* 254(21):11047-50.
- tem CB, Stockler-Ipsiroglu S, Stromberger C, Muhl A, Alessandri MG, Bianchi MC, Tosetti M, Fornai F, Cioni G. 2001. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am J Hum Genet* 69(5):1127-33.
- Item CB, Mercimek-Mahmutoglu S, Battini R, Edlinger-Horvat C, Stromberger C, Bodamer O, Muhl A, Vilaseca MA, Korall H, Stockler-Ipsiroglu S. 2004. Characterization of seven novel mutations in seven patients with GAMT deficiency. *Hum Mutat* 23(5):524.
- IJimenez A, Carrasco L, Vazquez D. 1977. Enzymic and nonenzymic translocation by yeast polysomes. Site of action of a number of inhibitors. *Biochemistry* 16(21):4727-30.
- Jin S, Levine AJ. 2001. The p53 functional circuit. *J Cell Sci* 114(Pt 23):4139-40.



- John SWM, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR. 1991. A Rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. *Nucl. Acids Res.* 19(2):408.
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(21):11848-52.
- Johnston K, Plawner L, Cooper L, Salomons G, Verhoeven N.M. and Jakobs C. 2005. The Second Family with AGAT Deficiency (Creatine Biosynthesis Defect): Diagnosis, Treatment and the First Prenatal Diagnosis. American Society of Human Genetics, 2005 Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, USA, p.58 (abstract).
- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 18(3):283-93.
- Kay L, Nicolay K, Wieringa B, Saks V, Wallimann T. 2000. Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J Biol Chem* 275(10):6937-44.
- Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 14(10):1074-81.
- Kim J, Wong PK. 2009. Oxidative stress is linked to ERK1/2-p16 signaling-mediated growth defect in ATM-deficient astrocytes. *J Biol Chem* 284(21):14396-404.
- Kingsley M, Cunningham D, Mason L, Kilduff LP, McEneny J. 2009. Role of creatine supplementation on exercise-induced cardiovascular function and oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2(4):247-54.
- Kleefstra T, Rosenberg EH, Salomons GS, Stroink H, van Bokhoven H, Hamel BC, de Vries BB. 2005. Progressive intestinal, neurological and psychiatric problems in two adult males with cerebral creatine deficiency caused by an SLC6A8 mutation. *Clin Genet* 68(4):379-81.
- Komoto J, Huang Y, Takata Y, Yamada T, Konishi K, Ogawa H, Gomi T, Fujioka M, Takusagawa F. 2002. Crystal structure of guanidinoacetate methyltransferase from rat liver: a model structure of protein arginine methyltransferase. *J Mol Biol* 320(2):223-35.
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90(1-2):41-54.
- Kues WA, Anger M, Carnwath JW, Paul D, Motlik J, Niemann H. 2000. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. *Biol Reprod* 62(2):412-9.
- Kumar S, Boehm J, Lee JC. 2003. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2(9):717-26.
- Lanpher B, Brunetti-Pierri N, Lee B. 2006. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. *Nat Rev Genet* 7(6):449-60.

- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R and others. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21):2947-8.
- Lehner B. 2007. Modelling genotype-phenotype relationships and human disease with genetic interaction networks. *J Exp Biol* 210(Pt 9):1559-66.
- Lejeune F, Maquat LE. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* 17(3):309-15.
- Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. 1991. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24(2):203-14.
- Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgilis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E and others. 2007. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 117(3):683-92.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-75.
- Lunardi G, Parodi A, Perasso L, Pohvozcheva AV, Scarrone S, Adriano E, Florio T, Gandolfo C, Cupello A, Burov SV and others. 2006. The creatine transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. *Neuroscience* 142(4):991-7.
- Ma Q. 2010. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther* 125(3):376-93.
- Macias-Vidal J, Gort L, Lluch M, Pineda M, Coll MJ. 2009. Nonsense-mediated mRNA decay process in nine alleles of Niemann-Pick type C patients from Spain. *Mol Genet Metab* 97(1):60-4.
- Mancini GM, Catsman-Berrevoets CE, de Coo IF, Aarsen FK, Kamphoven JH, Huijmans JG, Duran M, van der Knaap MS, Jakobs C, Salomons GS. 2005. Two novel mutations in SLC6A8 cause creatine transporter defect and distinctive X-linked mental retardation in two unrelated Dutch families. *Am J Med Genet A* 132(3):288-95.
- Maquat LE. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2):89-99.
- Martindale JL, Holbrook NJ. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 192(1):1-15.
- Martinez-Munoz C, Rosenberg EH, Jakobs C, Salomons GS. 2008. Identification, characterization and cloning of SLC6A8C, a novel splice variant of the creatine transporter gene. *Gene* 418(1-2):53-9.
- Mattson MP. 2000. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(2):120-9.
- Meplan C, Richard MJ, Hainaut P. 2000. Redox signalling and transition metals in the control of the p53 pathway. *Biochem Pharmacol* 59(1):25-33.

- Mercimek-Mahmutoglu S, Stoeckler-Ipsiroglu S, Adami A, Appleton R, Araujo HC, Duran M, Ensenauer R, Fernandez-Alvarez E, Garcia P, Grolik C and others. 2006. GAMT deficiency: features, treatment, and outcome in an inborn error of creatine synthesis. *Neurology* 67(3):480-4.
- Mercimek-Mahmutoglu S, Stöckler-Ipsiroglu S. 2009. Creatine Deficiency Syndromes. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA).
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11(1):31-46.
- Meyer LE, Machado LB, Santiago AP, da-Silva WS, De Felice FG, Holub O, Oliveira MF, Galina A. 2006. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem* 281(49):37361-71.
- Nanto-Salonen K, Komu M, Lundbom N, Heinanen K, Alanen A, Sipila I, Simell O. 1999. Reduced brain creatine in gyrate atrophy of the choroid and retina with hyperornithinemia. *Neurology* 53(2):303-7.
- Nash SR, Giros B, Kingsmore SF, Rochelle JM, Suter ST, Gregor P, Seldin MF, Caron MG. 1994. Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. *Receptors Channels* 2(2):165-74.
- Nishikiori R, Nomura Y, Sawajiri M, Masuki K, Hirata I, Okazaki M. 2008. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *J Dent* 36(12):993-8.
- Nissim-Rafinia M, Kerem B. 2002. Splicing regulation as a potential genetic modifier. *Trends Genet* 18(3):123-7.
- Nissim-Rafinia M, Aviram M, Randell SH, Shushi L, Ozeri E, Chiba-Falek O, Eidelman O, Pollard HB, Yankaskas JR, Kerem B. 2004. Restoration of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function by splicing modulation. *EMBO Rep* 5(11):1071-7.
- Nissim-Rafinia M, Kerem B. 2005. The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends Genet* 21(9):480-3.
- O'Reilly M, Palfi A, Chadderton N, Millington-Ward S, Ader M, Cronin T, Tuohy T, Auricchio A, Hildinger M, Tivnan A and others. 2007. RNA interference-mediated suppression and replacement of human rhodopsin in vivo. *Am J Hum Genet* 81(1):127-35.
- Pizarro JG, Folch J, Vazquez De la Torre A, Verdaguer E, Junyent F, Jordan J, Pallas M, Camins A. 2009. Oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle regulation in B65 dopaminergic cell line. *Free Radic Res* 43(10):985-94.
- Poo-Arguelles P, Arias A, Vilaseca MA, Ribes A, Artuch R, Sans-Fito A, Moreno A, Jakobs C, Salomons G. 2006. X-Linked creatine transporter deficiency in two patients with severe mental retardation and autism. *J Inherit Metab Dis* 29(1):220-3.
- Pozzoli U, Sironi M. 2005. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci* 62(14):1579-604.

- Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. 2002. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30(17):3894-900.
- Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers HH, Fryns JP, deGrauw TJ and others. 2004. High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75(1):97-105.
- Rosenberg EH, Martinez Munoz C, Betsalel OT, van Dooren SJ, Fernandez M, Jakobs C, deGrauw TJ, Kleefstra T, Schwartz CE, Salomons GS. 2007. Functional characterization of missense variants in the creatine transporter gene (SLC6A8): improved diagnostic application. *Hum Mutat* 28(9):890-6.
- Roux-Rouquie M. 2000. Genetic and epigenetic regulation schemes: need for an alternative paradigm. *Mol Genet Metab* 71(1-2):1-9.
- Saks V, Dzeja P, Schlattner U, Vendelin M, Terzic A, Wallimann T. 2006. Cardiac system bioenergetics: metabolic basis of the Frank-Starling law. *J Physiol* 571(Pt 2):253-73.
- Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, Jakobs C. 2001. X-linked creatine-transporter gene (SLC6A8) defect: a new creatine-deficiency syndrome. *Am J Hum Genet* 68(6):1497-500.
- Sarsour EH, Kumar MG, Chaudhuri L, Kalen AL, Goswami PC. 2009. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 11(12):2985-3011.
- Scriver CR, Waters PJ. 1999. Monogenic traits are not simple: lessons from Phenylketonuria. *Trends Genet.* 15(7):267-272.
- Schmidt SP, Corydon TJ, Pedersen CB, Bross P, Gregersen N. 2010. Misfolding of short-chain acyl-CoA dehydrogenase leads to mitochondrial fission and oxidative stress. *Mol Genet Metab* 100(2):155-62.
- Schulze A, Mayatepek E, Bachert P, Marescau B, De Deyn PP, Rating D. 1998. Therapeutic trial of arginine restriction in creatine deficiency syndrome. *Eur J Pediatr* 157(7):606-7.
- Schulze A, Ebinger F, Rating D, Mayatepek E. 2001. Improving treatment of guanidinoacetate methyltransferase deficiency: reduction of guanidinoacetic acid in body fluids by arginine restriction and ornithine supplementation. *Mol Genet Metab* 74(4):413-9.
- Schulze A, Hoffmann GF, Bachert P, Kirsch S, Salomons GS, Verhoeven NM, Mayatepek E. 2006. Presymptomatic treatment of neonatal guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *Neurology* 67(4):719-21.
- Sempere A, Fons C, Arias A, Rodriguez-Pombo P, Colomer R, Merinero B, Alcaide P, Capdevila A, Ribes A, Artuch R and others. 2009a. Creatine transporter deficiency in two adult patients with static encephalopathy. *J Inherit Metab Dis.* Short Report #158 Online
- Sempere A, Fons C, Arias A, Rodriguez-Pombo P, Merinero B, Alcaide P, Capdevila A, Ribes A, Duque R, Eiris J and others. 2009b. [Cerebral creatine deficiency: First Spanish patients harbouring mutations in GAMT gene.]. *Med Clin (Barc)* 133(19):745-9.

- Sempere A, Arias A, Farre G, Garcia-Villoria J, Rodriguez-Pombo P, Desviat LR, Merinero B, Garcia-Cazorla A, Vilaseca MA, Ribes A and others. 2010. Study of inborn errors of metabolism in urine from patients with unexplained mental retardation. *J Inherit Metab Dis* 33(1):1-7.
- Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, Falcieri E, Agostini D, Gioacchini AM, Stocchi V. 2006. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 40(5):837-49.
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. 2000. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 28(9):1387-404.
- Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, Saprunova VB, Vyssokikh MY, Chernyak BV, Skulachev VP. 2002. Oligomycin, inhibitor of the F<sub>0</sub> part of H<sup>+</sup>-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* 21(53):8149-57.
- Shojaiefard M, Christie DL, Lang F. 2005. Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* 334(3):742-6.
- Shojaiefard M, Christie DL, Lang F. 2006. Stimulation of the creatine transporter SLC6A8 by the protein kinase mTOR. *Biochem Biophys Res Commun* 341(4):945-9.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5(5):415-8.
- Snow RJ, Murphy RM. 2001. Creatine and the creatine transporter: a review. *Mol Cell Biochem* 224(1-2):169-81.
- Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS. 1997. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature* 389(6647):187-90.
- Speer O, Neukomm LJ, Murphy RM, Zanolla E, Schlattner U, Henry H, Snow RJ, Wallimann T. 2004. Creatine transporters: a reappraisal. *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2):407-24.
- Stockler S, Holzbach U, Hanefeld F, Marquardt I, Helms G, Requart M, Hanicke W, Frahm J. 1994. Creatine deficiency in the brain: a new, treatable inborn error of metabolism. *Pediatr Res* 36(3):409-13.
- Stockler S, Isbrandt D, Hanefeld F, Schmidt B, von Figura K. 1996. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet* 58(5):914-22.
- Straumann N, Wind A, Leuenberger T, Wallimann T. 2006. Effects of N-linked glycosylation on the creatine transporter. *Biochem J* 393(Pt 2):459-69.
- Strutz-Seebohm N, Shojaiefard M, Christie D, Tavaré J, Seebohm G, Lang F. 2007. PIKfyve in the SGK1 mediated regulation of the creatine transporter SLC6A8. *Cell Physiol Biochem* 20(6):729-34.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-72.

- Tan M, Li S, Swaroop M, Guan K, Oberley LW, Sun Y. 1999. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem* 274(17):12061-6.
- Tazi J, Durand S, Jeanteur P. 2005. The spliceosome: a novel multi-faceted target for therapy. *Trends Biochem Sci* 30(8):469-78.
- Thannickal VJ. 2009. Oxygen in the evolution of complex life and the price we pay. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40(5):507-10.
- Thein SL. 2004. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol* 124(3):264-74.
- Thornton TM, Rincon M. 2009. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci* 5(1):44-51.
- Torres GE, Carneiro A, Seamans K, Fiorentini C, Sweeney A, Yao WD, Caron MG. 2003. Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J Biol Chem* 278(4):2731-9.
- Uzdensky A.B. (2008) Signal Transduction and Photodynamic Therapy. - Current Signal Transduction Therapy. 3: 55-74.
- Valayannopoulos V, Boddaert N, Mention K, Touati G, Barbier V, Chabli A, Sedel F, Kaplan J, Dufier JL, Seidenwurm D and others. 2009. Secondary creatine deficiency in ornithine delta-aminotransferase deficiency. *Mol Genet Metab* 97(2):109-13.
- van Spronsen FJ, Reijngoud DJ, Verhoeven NM, Soorani-Lunsing RJ, Jakobs C, Sijens PE. 2006. High cerebral guanidinoacetate and variable creatine concentrations in argininosuccinate synthetase and lyase deficiency: implications for treatment? *Mol Genet Metab* 89(3):274-6.
- Verbruggen KT, Knijff WA, Soorani-Lunsing RJ, Sijens PE, Verhoeven NM, Salomons GS, Goorhuis-Brouwer SM, van Spronsen FJ. 2007. Global developmental delay in guanidinoacetate methyltransferase deficiency: differences in formal testing and clinical observation. *Eur J Pediatr* 166(9):921-5.
- Vodopituz J, Item CB, Hausler M, Korall H, Bodamer OA. 2007. Severe speech delay as the presenting symptom of guanidinoacetate methyltransferase deficiency. *J Child Neurol* 22(6):773-4.
- Vousden KH. 2010. Alternative fuel--another role for p53 in the regulation of metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(16):7117-8.
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. 1992. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 (Pt 1):21-40.
- Wallimann T, Hemmer W. 1994. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. *Mol Cell Biochem* 133-134:193-220.
- Wallimann T. 2007. Introduction--creatine: cheap ergogenic supplement with great potential for health and disease. *Subcell Biochem* 46:1-16.



- Wang J, Chang YF, Hamilton JI, Wilkinson MF. 2002. Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol Cell* 10(4):951-7.
- Wang J, Smith PJ, Krainer AR, Zhang MQ. 2005. Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Res* 33(16):5053-62.
- Wilcken B, Fagan E, Sim KG, Carpenter K and Salomons GS. 2008. Creatine transporter defect: results of 6 months treatment. *J Inher Metab Dis*. Lisboa; 31 supl 1, 278P (abstract)
- Wyss M, Smeitink J, Wevers RA, Wallimann T. 1992. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1102(2):119-66.
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R. 2000. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80(3):1107-213.
- Wyss M, Schulze A. 2002. Health implications of creatine: can oral creatine supplementation protect against neurological and atherosclerotic disease? *Neuroscience* 112(2):243-60.
- Xu W, Liu L, Gorman PA, Sheer D, Emson PC. 1997. Assignment of the human creatine transporter type 2 (SLC6A10) to chromosome band 16p11.2 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 76(1-2):19.
- Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. 2005. Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437(7056):215-23.
- Zhu Y, Prives C. 2009. p53 and Metabolism: The GAMT Connection. *Mol Cell* 36(3):351-2.
- Zugno AI, Franzon R, Chiarani F, Bavaresco CS, Wannmacher CM, Wajner M, Wyse AT. 2004. Evaluation of the mechanism underlying the inhibitory effect of guanidinoacetate on brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. *Int J Dev Neurosci* 22(4):191-6.
- Zugno AI, Stefanello FM, Scherer EB, Mattos C, Pederzoli CD, Andrade VM, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse AT. 2008. Guanidinoacetate decreases antioxidant defenses and total protein sulfhydryl content in striatum of rats. *Neurochem Res* 33(9):1804-10.





## 8. ANEXO





Tabla A: Casos seleccionados con sospecha de deficiencia en el transporte de Cr

Paciente	Origen	GAA VN: 13-139 <11a VN: 12-100 >12a mmol/mol creat	Creatina VN: 12-9500 μmol/l	Creat/creatin VN: <1,5	Historial clínico	Posible defecto
P-1	Barcelona Institucionalizado	87	-----	3,2- 4,9	Varón 11a, retraso psicomotor, comportamiento autista y epilepsia ausencia pico creatina en espectroscopia de resonancia magnética.	CRT1
P-2	Cribado CEDEM	101		4,42-3,7	Varón 2,5a, retraso psicomotor, convulsión, ausencia lenguaje, ausencia pico creatina en espectroscopia de resonancia magnética.	CRT1
P-3	Barcelona Institucionalizado	64	-----	3,0	Varón 40a, retraso mental severo, alteración conducta y comportamiento autista, epilepsia refractaria. Ausencia de lenguaje verbal.	CRT1
P-4	Cribado CEDEM	89-152	9236-15351	2,09-3,28	Varón 4a, retraso psicomotor leve, marcha torpe, retraso lenguaje, atención dispersa, inquieto. Tío materno con crisis convulsivas y CI bajo.	CRT1
P-5	Cribado Barcelona	-----	-----	1,9; 2,7	Varón 16a, retraso mental, convulsiones y autismo	CRT1
P-6	Barcelona Institucionalizado	-----	-----	2,4-4,1	Varón 8a, trastorno generalizado del desarrollo, distonías, ausencia de lenguaje, epilepsia.	CRT1
P-10	Cribado CEDEM	100-95	11329-11581	1,71-2,43	Varón 6a ,retraso psicomotor y comportamiento autista	CRT1
P-11	Cribado CEDEM	236-419	179-2442	2,05-3,46	Mujer 11m, retraso psicomotor ,hipotonía, rechazo alimentos y macrocefalia	CRT1
P-12	Cribado CEDEM	158-202	6110-14321	3,40-6,45	Varón 3a, retraso psicomotor y retraso lenguaje	CRT1
P-13	Cribado Barcelona	-----	-----	-----	Varón	CRT1
P-14	Cribado CEDEM	121-128	5639-11923	1,64-2,87	Varón 2a retraso desarrollo y retraso lenguaje	CRT1
P-15	Cribado CEDEM	-----	-----	1,68 -2,3	Varón 8m, retraso psicomotor y estereotipias	CRT1

VN: valores normales.

Tabla B: Casos seleccionados con sospecha de deficiencia de GAMT

Paciente	Origen	GAA 13-139 (<11a) 12-100(>12a) mmol/mol creat	Actividad GAMT pmol/h/mg prot	Historial clínico	Posible defecto
P-7	Barcelona Institucionalizado	228	2,8	Mujer 23a. Tiene un fenotipo severo, espectroscopia	GAMT
P-8	Barcelona Institucionalizado	374	3,7	Mujer 12a con retraso mental grave y epilepsia mioclónica refractaria.	GAMT
P-9	Barcelona Institucionalizado	201	4,1	Varón 47a, retraso mental	GAMT
P-20	Barcelona Institucionalizado	180	-----	Mujer 10a, retraso mental	GAMT

Tabla C: Casos seleccionados con sospecha de deficiencia de AGAT

Paciente	Origen	Plasma (μmol/l) 0,7-2,7	Historial clínico	Posible defecto
P-16	Cribado Barcelona	0,6	Mujer 22m	AGAT
P-17	Cribado Barcelona	0,45	Varón 4,5a	AGAT
P-18	Cribado Barcelona	-----	Varón 63a	AGAT
P-19	Cribado Barcelona	-----	Mujer 14m	AGAT

## 9. PUBLICACIONES





Parte de este trabajo se encuentra descrito en las siguientes publicaciones:

“Defining the pathogenicity of the creatine deficiency síndrome” **P Alcaide**, B Merinero, P Ruiz-Sala, E Richard, R Navarrete, A Arias, A Ribes, R Artuch, J Campistol, M Ugarte, P Rodríguez-Pombo. Hum Mut (2010) (*En prensa*).

“A new case of creatine transporter deficiency associated with mild clinical phenotype and a novel mutation in the SLC6A8 gene” **P Alcaide**, P Rodríguez-Pombo, P Ruiz Sala, I Ferrer, P Castro, Y Ruiz Martín, B Merinero, M Ugarte. Dev Med & Child Neurol. (2010) 52, 2, 215-217

“Creatine transporter deficiency in two adult patients with static encephalopathy” Sempere A, Fons C, Arias A, Rodríguez-Pombo P, Merinero B, **Alcaide P**, Capdevila A, Ribes A, Artuch R, Campistol J. J Inher Met Dis (2009) Short Report Online.

“Cerebral creatine deficiency: First Spanish patients harbouring mutations in GAMT gene”. Sempere A, Fons C, Arias A, Rodríguez-Pombo P, Merinero B, **Alcaide P**, Capdevila A, Ribes A, Duque R, Eirís J, Poo P, Fernández-Alvarez E, Campistol J, Artuch R. Med Clin . (2009), 133 (19): 745-9.